

**Das humane CD4 Molekül als Zielstruktur zur therapeutischen Beeinflussung
zellulärer Immunantworten in einem transgenen Tiermodell**

Dissertation
Zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med.

An der Medizinischen Fakultät der
Universität Leipzig

eingereicht von: Stefan Köhler
geboren am 27.02.1977 in Gotha

angefertigt an: der Universität Leipzig
am Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin
(Max-Bürger-Forschungszentrum)

Betreuer: Herr Prof. Dr. med. F. Emmrich
Herr Dr. rer. nat. R. Laub

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 19.05.2015

Meiner Familie

Bibliographische Beschreibung:

Köhler, Stefan

Das humane CD4 Molekül als Zielstruktur zur therapeutischen Beeinflussung zellulärer Immunantworten in einem transgenen Tiermodell

Universität Leipzig, Dissertation

86 Seiten, 138 Literaturangaben, 19 Abbildungen, 4 Tabellen

Referat:

In einem komplexen tierexperimentellen Ansatz wurde das Potenzial der anti-*hu*CD4-Antikörper MAX16H5 und MAX12F6 zur Modulation zellvermittelter Immunreaktionen *in vivo* untersucht. Dafür kam ein mehrfach transgenes Mausmodell zur Anwendung, in dem das humane Zielmolekül und dessen physiologischer Ligand als Transgene exprimiert waren. Als T-Zell vermittelte Immunreaktion wurde eine Kontaktreaktion (delayed type hypersensitivity, DTH) gegen DNFB etabliert und validiert. An der DTH wurde untersucht, ob und wie die verschiedenen Antikörper die Sensibilisierungs- und die Auslösungsphase beeinflussen. Die experimentellen Ergebnisse zeigen, dass die Antikörper epitop- und isotypabhängig die beiden Phasen der DTH unterschiedlich beeinflussen. Die Applikation der Antikörper während der Sensibilisierung führte zu einer unterschiedlich ausgeprägten Suppression der DTH. Dagegen hatten sie gegensätzliche Effekte auf die Auslösung. Während nach MAX12F6-Behandlung eine stärkere und prolongierte DTH gemessen wurde, verlief die DTH-Reaktion nach MAX16H5-Applikation deutlich abgeschwächt. Mittels flowzytometrischer Analysen konnte gezeigt werden, dass die Antikörper unterschiedliche Subpopulationen der T-Helferzellen depletieren. Darüber hinaus führte MAX16H5 offensichtlich zur Induktion regulatorischer T-Zellen. Die Daten erklären unterschiedliche Erfolge aus ersten klinischen Studien mit verschiedenen anti-*hu*CD4-Antikörpern. Auch eignet sich CD4 auch als diagnostisches Target zur *in vivo* Diagnostik T-Zell vermittelter Entzündungsreaktionen. Mit Antikörperfragmenten von MAX16H5 wurde ein immunszintigraphisches Verfahren entwickelt, das die spezifische Darstellung der mit der DTH einhergehenden Entzündungsreaktion ermöglicht.

Inhaltsverzeichnis

A	Abbildungsverzeichnis	IV
B	Tabellenverzeichnis	V
C	Abkürzungsverzeichnis	V
1	Einleitung und Aufgabenstellung	1
1.1	Die delayed type hypersensitivity (DTH) ist eine zelluläre Immunreaktion die durch T-Lymphozyten vermittelt wird	1
1.2	Experimentelle Anwendung monoklonaler anti-CD4-Antikörper	5
1.3	Das humane CD4/DR3 mehrfach transgene Mausmodell	7
1.4	Beeinflussung der DTH durch anti CD4 Behandlung	8
1.5	Zielstellung der Arbeit	8
2	Material und Methoden	10
2.1	Material	10
2.1.1	Versuchstiere und deren Haltung	10
2.1.1.1	Tierhaltung	10
2.1.1.2	Transgene Mäuse	10
2.1.1.3	Kontrolltiere	11
2.1.2	Verwendete Antikörper	12
2.1.2.1	Monoklonale Antikörper für zelluläre Analysen	12
2.1.2.2	anti- <i>hu</i> CD4-Antikörper zur experimentellen Therapie	12
2.1.3	Reagenzien	13
2.1.4	Pufferlösungen	14
2.1.5	Geräte	15
2.2	Methoden	16
2.2.1	Aufbereitung des Kontaktallergens und dessen Trägerlösung	16
2.2.2	Sensibilisierung der Versuchstiere gegenüber DNFB	16
2.2.3	Auslösung der DTH	17
2.2.4	Messung der DTH	17
2.2.5	Applikation der monoklonalen Antikörper	17
2.2.5.1	anti- <i>hu</i> CD4-Behandlung während der Sensibilisierungsphase	18
2.2.5.2	anti- <i>hu</i> CD4-Behandlung während der Auslösungsphase	18
2.2.6	Narkotisierung der Versuchstiere	19
2.2.7	Bildgebung für die THZ-Kompartimente (Immunszintigraphie)	19

2.2.7.1	Markierung von MAX16H5 F(ab)- und F(ab') ₂ -Fragmenten mit ¹¹¹ In	19
2.2.7.2	Injektion der ¹¹¹ In-markierten anti- <i>hu</i> CD4-Fragmente	20
2.2.7.3	Bildgebung von THZ Kompartimenten mit der Gamma Kamera (Szintigraphie)	20
2.2.7.4	Nachweis pathologischer THZ Anreicherungen im Gamma Counter	20
2.2.8	Durchflusszytometrische Analysen	21
2.2.8.1	Messprinzip	21
2.2.8.2	Phänotypisierung zirkulierender Lymphozyten	22
2.2.9	Berechnung und Statistik	23
3	Ergebnisse	25
3.1	In allen Versuchstieren kann eine spezifische DTH gegen DNFB induziert werden	25
3.1.1	Das Verfahren zur Ohrdickenmessung ist sicher und reproduzierbar	25
3.1.2	DTH an sensibilisierten <i>hu</i> CD4/DR3-Mäusen	27
3.1.3	Die DTH an sensibilisierten Kontrolltieren	30
3.1.4	Die mehrfache Auslösung induziert eine gesteigerte DTH	31
3.1.5	Die verzögerte Auslösung führt zur verminderten DTH	32
3.2	Unterbrechung der <i>hu</i> CD4 – HLA-DR3 Interaktion führt zu gesteigerter DTH	34
3.3	¹¹¹ In-markierte anti- <i>hu</i> CD4-Fragmente ermöglichen die Lokalisierung und die Quantifizierung von THZ Kompartimenten	37
3.3.1	Bildgebung mit ¹¹¹ In-markierten anti- <i>hu</i> CD4-Fragmenten	37
3.3.2	Quantifizierung der THZ Anreicherung in der DTH mittels Gamma Counter	41
3.4	Die Sensibilisierung mit DNFB wird durch anti- <i>hu</i> CD4 beeinflusst	42
3.4.1	Sensibilisierung unter anti- <i>hu</i> CD4 vermindert die DTH	42
3.4.2	anti- <i>hu</i> CD4 depletiert periphere THZ und vermindert deren CD4-Expression	44
3.5	Die Auslösung der DTH wird durch anti- <i>hu</i> CD4 beeinflusst	49
3.5.1	MAX16H5 und MAX12F6 wirken gegensätzlich auf die DTH	49
3.5.2	MAX16H5 und MAX12F6 depletieren unterschiedliche THZ Subpopulationen	51
4	Diskussion	57
4.1	Diskussion der Methoden	57
4.2	Validierung eines DTH Modells in der <i>hu</i> CD4/DR3 tripel transgenen Maus	59

4.3	Eine Verzögerung der Auslösung führt zu einer schwächer ausgeprägten Reaktion gegen DNFB	61
4.4	Eine wiederholte Auslösung führt zu einer stärkeren und länger anhaltenden Gewebsschwellung	61
4.5	Die Bedeutung der MHC II – CD4 Interaktion für die DTH	62
4.6	Sensibilisierungs- und Auslösungsphase werden durch anti- <i>hu</i> CD4-mAk beeinflusst, wobei Epitop und Isotyp von Bedeutung sind	64
4.7	CD4 als innovatives Target zur molekularen Bildgebung der chronischen Entzündung mittels ¹¹¹ In markierten MAX16H5-Fab Fragmenten	67
4.8	Induktion regulatorischer T-Zellen durch MAX16H5	69
5	Zusammenfassung	73
6	Literaturverzeichnis	76

A Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Ohrdicken variieren interindividuell stärker als intraindividuell	26
Abb. 2: Unabhängige Ohrdickenbestimmung durch zwei Operanten zeigen die Robustheit der Messmethode	27
Abb. 3: DNFB induziert eine signifikante Ohrschwellung nur nach Sensibilisierung	28
Abb. 4: Das Maximum der Ohrschwellung wird nach 48 h erreicht	30
Abb. 5: Das Ausmaß der DTH-Reaktion an C57/BL6 Mäusen ist vergleichbar mit <i>huCD4/DR3</i> -Mäusen	31
Abb. 6: Eine wiederholte Reexposition mit DNFB induziert eine signifikant stärkere Ohrschwellung	32
Abb. 7: Die Verlängerung des Intervalls zwischen Sensibilisierung und Auslösung führt zu verringerter Ohrschwellung	33
Abb. 8: Ohne CD4 Kostimulation (CD4 KO Mäuse) ist die DTH gesteigert	35
Abb. 9: Ohne MHC II-Moleküle (MHC II KO Mäuse) ist die DTH gesteigert	36
Abb. 10: Ohne MHC II und <i>huCD4</i> (<i>huCD4</i> -/DR3-/ <i>mucd4</i> - Maus) ist die DTH gesteigert	37
Abb. 11: Versuchsanordnung für Szintigramm der <i>huCD4/DR3</i> Mäuse und CD4 KO Maus	38
Abb. 12: Mittels ^{111}In markierter F(ab)-Fragmente von MAX16H5 lässt sich spezifisch eine chronische Entzündungsreaktion darstellen	40
Abb. 13: Mittels ^{111}In markiertem F(ab)-Fragment lässt sich spezifisch eine Entzündungsreaktion detektieren	42
Abb. 14: Eine anti- <i>huCD4</i> -Behandlung während der Sensibilisierungsphase führt zu einer verringerten DTH	44
Abb. 15: Eine MAX16H5 und MAX12F6 Behandlung während der Sensibilisierungsphase führt zur Depletion von TH-Zellen	47
Abb. 16: Reduktion von CD62L positiven/CD25 positiven TH-Zellen durch eine MAX16H5 und MAX12F6 Behandlung während der Sensibilisierungsphase	49
Abb. 17: Eine MAX16H5 Behandlung während der Auslösungsphase verringert signifikant die DTH gegen DNFB	51
Abb. 18: MAX16H5 Behandlung während der Auslösungsphase einer Kontaktallergie führt zu einer Downmodulation des <i>huCD4</i> Moleküls	54

Abb. 19: MAX16H5 und MAX12F6 führen zu einer Reduktion der CD62L positiven/CD25 positiven TH-Zellen	56
--	----

B Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Spezifische monoklonale Antikörper	12
Tab. 2: Unspezifische monoklonale Isotyp-Kontroll-Antikörper	12
Tab. 3: Die Ohrdickenmessung mittels Außentaster „Oditest“ ist reproduzierbar	26
Tab. 4: Ohrdickenänderung nach Korrektur unspezifischer Schwellungseffekte (Reibung durch Auftragen und Messen, Vehikeleffekt).	29

C Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APZ	antigenpräsentierende Zelle
CD	Cluster of differentiation
CD4	CD4 Molekül
CD4 KO	CD4 defizienter genetischer Hintergrund
CD8	CD8 Molekül
DNFB	2,4-Dinitrofluorbenzen
DTH	delayed type hypersensitivity
DR3	human leucocyte antigen (HLA) DR3 Variante
FACS	fluorescence activated cell sorting
F(ab)	Antikörperfragment bestehend aus: V _H , C _H 1, V _L und C _L
F(ab') ₂	Antikörperfragment bestehend aus 2 über Disulfidbrücken assoziierten Fab Fragmenten
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Iso-Thio-Cyanat
FL	Fluoreszenz
g	Gramm
HLA	human leucocyte antigen

<i>hu</i> CD4	humanes CD4 Molekül
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IKIT	Institut für klinische Immunologie und Transfusionsmedizin
IL	Interleukin
KG	Körpergewicht
KO	knock out
LT	Lymphotoxin
mAk	monoklonaler Antikörper
MHC	major histocompatibility complex
MHC II KO	MHC II defizienter genetischer Hintergrund
<i>mu</i> cd4	murines (Maus) cd4 Molekül
MW	Mittelwert
NKZ	natürliche Killerzellen
PBMZ	Peripherblut mononukleare Zellen
PBS	phosphat buffered saline, phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PE	Phycoerythrin
Stabw.	Standardabweichung
THZ	T-Helfer-Lymphozyten
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Treg	regulatorische T-Helfer-Lymphozyten
TZ	T-Lymphozyten
TZR	T-Zell-Rezeptor

1 Einleitung und Aufgabenstellung

1.1 Die delayed type hypersensitivity (DTH) ist eine zelluläre Immunreaktion die durch T-Lymphozyten vermittelt wird

Die allergische Kontaktdermatitis ist die am häufigsten auftretende Dermatose. Sie betrifft etwa 3% der Bevölkerung (Enk 1997, Grabbe und Schwarz 1998). Allergische Kontaktdermatitis, Kontakthypersensitivität (Kontaktallergie) und allergisches Kontaktekzem werden synonym verwendet und definieren einen haptenspezifischen T-Zell vermittelten inflammatorischen Prozess der Haut (Gell und Benacerraf 1961). Diese Reaktionsform wird auch als „delayed type hypersensitivity“ (DTH) bezeichnet, da es erst 24-72 Stunden nach wiederholtem Allergenkontakt zu einer maximalen Ausprägung der Reaktion mit deutlich sichtbarem Ödem und anschließendem Rückgang der Symptome kommt (Werfel und Kapp 2000). Kontaktallergene oder Haptene sind Chemikalien, welche ein niedriges Molekulargewicht haben und selbst nicht immunogen sind. Zunächst müssen sie an epidermale Proteine binden, um den Hapten-Carrier Komplex zu bilden (Dupuis et al. 1980). Alle Kontaktallergene sind elektrophile Substanzen, welche kovalent an den nukleophilen Rest von epidermalen Proteinen binden (Lepoittevin and Leblonde 1997). Starke Haptene, wie Oxazolone, DNFB oder FITC führen gewöhnlich zur Sensibilisierung und eignen sich dadurch zur experimentellen Untersuchung der Kontaktallergie im Tiermodell. DNFB (2,4-Dinitrofluorbenzen) wurde erstmals 1964 von Levin et al. zur Induktion einer Kontaktallergie verwendet. DNFB reagiert zunächst mit der Aminogruppe verschiedener Aminosäuren und es entstehen DNP-Aminosäuren, welche als Antigen dienen.

Während der Sensibilisierungsphase tritt das Hapten in die Epidermis ein und wird von Langerhanszellen, den antigenpräsentierenden Zellen der Epidermis, aufgenommen (Silberberg et al. 1974). Diese verankern den Hapten-Carrier Komplex auf MHC I- und MHC II-Molekülen an ihrer Oberfläche. Daraufhin kommt es zu einer morphologischen, phänotypischen und funktionellen Änderung dieser Zellen (Aiba und Katz 1990). Die Veränderungen treten nicht nach Kontakt mit einer irritativen Substanz oder nur mit der benutzten Trägerlösung allein auf (Katz et al. 1995). Über afferente Lymphgefäße wandern die so beladenen und veränderten Langerhanszellen in die parakortikale T-Region der regionalen Lymphknoten, wo sie

zu potenten antigenpräsentierenden Zellen ausreifen (Kripke et al. 1990) und nach 24 Stunden in hoher Anzahl vorliegen (Macatonia et al. 1986). Im Lymphknoten präsentieren sie den Hapten-Carrier Komplex über MHC I und MHC II Moleküle den T-Zellen. T-Zellen mit „passendem“ T-Zell-Rezeptor werden aktiviert. Dabei exprimieren sie u.a. sogenannte „Homingfaktoren“, wie das „cutaneous lymphocyte antigen“ (CLA), die es ihnen ermöglichen, die postkapillären Venen der Dermis zu verlassen und ins Gewebe einzuwandern (Santamaria-Babi et al. 1995). Gleichzeitig werden durch die epidermale Langerhanszellen (innerhalb 15min), Keratinozyten, und die aktivierten T-Zellen wichtige proinflammatorische Zytokine freigesetzt (IL-1 und IL-6). Nach ca. 1 Stunde lässt sich ein erhöhter IFN- γ Spiegel feststellen, dieses wird sowohl von CD4+ als auch CD8+ T-Zellen produziert. Des Weiteren steigt 6 Stunden nach Kontakt die Expression von MHC II auf Langerhanszellen. Steigende Zytokinspiegel und MHC Expression sind allergenspezifische Ereignisse und können nicht nach Kontakt mit der Trägerlösung nachgewiesen werden. Das Zytokinprofil der DTH entspricht einem Typ-1-Zytokinprofil welches eine spezifische CD4+ TH1-Zell-Proliferation stimuliert. Im Verlauf wird auch IL-10 freigesetzt, welches die Aktivierung antigenpräsentierende Zellen und die Proliferation von CD4+ TH1-Zellen hemmt (Aiba und Katz 1990, Enk et al. 1993, Enk und Katz 1995). Die Sensibilisierungsphase dauert im Menschen 8 bis 15 Tage, in der Maus nur 5 bis 7 Tage (Krasteva et al. 1999).

Während der Auslösungsphase genügen geringste Mengen des Kontaktallergens, um die haptenspezifischen CLA+ TH-Zellen durch Langerhanszellen erneut zu aktivieren (Kalish und Johnson 1990). Wiederum kommt es zur Freisetzung von Typ-1-Zytokinen durch aktivierte T-Zellen, Keratinozyten, Langerhanszellen und Makrophagen (Krasteva et al. 1999, Xu et al. 1997, Kapsenberg et al. 1992, Cavani et al. 1998). Die Aktivierung endothelialer Zellen stellt einen wichtigen Schritt dar, da diese Adhäsionsmoleküle (Selectine, Integrine, Chemokine) in den postkapillären Venen exprimieren und die Extravasation inflammatorischen Zellen in die Dermis ermöglichen (Smith et al. 1993). Immunhistochemische Analysen konnten zeigen, dass nach 12 Stunden IFN- γ produzierende CD8+ T-Zellen und nach 24 Stunden CD4+ TH-Zellen in die Epidermis und Dermis an der Stelle des Haptenkontaktes einströmen. Die eingewanderten CD8+ T-Zellen können dann über Perforin und das Fas/Fas Ligand System die Apoptose von Keratinozyten induzieren. Dies führt zur weiteren Synthese von inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen und damit zu

einem massiven Infiltrat von mononukleären und polymorphnukleären Zellen (Kehren et al. 1999, Akiba et al. 2002, Gorbachev und Fairchild 2004). Auch sind nicht-antigenspezifische Effektorzellen, Fibrinablagerungen und eine gesteigerte Gefäßpermeabilität nachweisbar (Phanuphak et al. 1974). Die akute Reaktion tritt wenige Stunden nach Haptenkontakt auf. Sie erreicht ihr Maximum im Menschen nach etwa 72 Stunden, in der Maus schon nach 24 bis 48 Stunden. Die Entzündungsreaktion hält über mehrere Tage an (Krasteva et al. 1999 a, b). Für FITC z.B. sind die histopathologischen Veränderungen in der Haut noch 3 Wochen nach Induktion einer Kontaktallergie nachweisbar (Takeshita et al. 2004).

Die Subpopulationen von TZ, welche die DTH vermitteln, werden teilweise kontrovers diskutiert. Kapsenberg et al. (1992) zeigten, dass der überwiegende Teil von haptensspezifischen TZ, welche aus Läsionen von Nickel und Kobalt Kontaktallergien gewonnen wurden, CD4⁺ TH1 sind, welche ein Typ-1-Zytokinmuster sezernieren. Dieses legt die Vermutung nahe, dass CD4⁺ TH1-Zellen die Effektorzellen der DTH sind. Experimente mit *mucd4*-defizienten Mäusen bzw. die Behandlung mit depletierenden anti- *mucd4* Antikörpern unterstützen diese Hypothese. Solche Tiere zeigten eine schwächere DTH (Fujisawa et al. 1994, Miller S.D. und Jenkins M.K. 1985, Podolin et al. 2000, Kondo et al. 1996, Saint-Mezard et al. 2005).

In den drainierenden Lymphknoten von sensibilisierten Mäusen können *mucd4*⁺ TH1 in hoher Anzahl nachgewiesen werden. Durch Injektion dieser haptensspezifischen *mucd4*⁺ TH1-Zellen können Tiere gegenüber einem Kontaktallergen sensibilisiert werden (Gautam et al. 1991). Dieses konnte Schwarz et al. (1998) durch die vorhergehende Behandlung mit einem anti *mucd4* mAk, nicht aber mit anti CD8 verhindern. Durch *in vitro* priming von naiven T-Zellen mittels Langerhanszellen von sensibilisierten Mäusen können haptensspezifische *mucd4*⁺ TH1-Zellen erzeugt werden, welche nach Injektion in unbehandelte Tiere eine Kontaktallergie erzeugen (Hauser 1990). Diese Untersuchungen legen den Schluss nahe, dass MHC II-restringierte CD4⁺ TH1-Zellen eine wichtige Effektorfunktion in der Induktion einer Kontaktallergie erfüllen.

Im Gegensatz zu diesem Verständnis der DTH kommen mehrere Autoren zu dem Schluss, dass MHC I restringierte CD8⁺ TZ die Effektorfunktion erfüllen und die beteiligten auf CD4⁺ TH1-Zellen eine regulatorische Funktion ausüben. So konnten Nickel-spezifische CD8⁺ T-Zellen aus dem peripheren Blut von an einer Nickelallergie leidenden Menschen isoliert werden. Sie weisen einen Typ-1

(zytotoxischen) Phänotyp auf (Cavani et al. 1998). Diese sezernieren Typ 1 Zytokine (Mosmann et al. 1996, Xu et al. 1996) und sind nicht zur B-Zell-Hilfe fähig. (Sad et al. 1995). In den Lymphknoten von Wildtyp-Mäusen kann 4 bis 5 Tage nach Sensibilisierung eine hohe Zahl von haptenspezifischen CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden, welche IFN- γ sezernieren. An den Tagen 8 und 9 erreichten die CD8⁺ T-Zellen wieder Ausgangswerte (Gorbachev und Fairchild 2004). Die *in vivo* Depletion CD8⁺ TZ verringert die allergischen Reaktion gegen DNFB und Dimethylbenzantrazen im Mausmodell (Anderson et al. 1995, Gocinski und Tigelaar 1990, Xu et al. 1996).

Im Gegensatz dazu wurde nach anti-*mucd4*-Behandlung eine überschießende Reaktion auf DNFB beobachtet (Gocinski und Tigelaar 1990). MHC I-defiziente Mäuse entwickeln keine Kontaktallergie, während MHC II-defiziente Tiere überschießende Reaktionen aufwiesen. Somit könnten CD8⁺ T-Zellen ohne Hilfe von *mucd4*⁺ T-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen geprimed werden (Bour et al. 1995). Diese starken DTH Antworten konnten durch anti-CD8-Behandlung oder durch Injektion von Wildtyp-TH-Zellen reduziert werden (Blouloc et al. 1998).

Das Ausmaß der Kontaktallergie gegen DNFB korreliert mit der Anzahl von haptenspezifischen CD8⁺T-Zellen, welche IFN- γ produzieren und in den drainierenden Lymphknoten nachweisbar sind (Gorbachev und Fairchild 2004, Kish et al. 2005, Gorbachev und Fairchild 2004). Außerdem konnte beobachtet werden, dass MHC II-defiziente dendritische Zellen haptenspezifische Immunantworten *in vitro* und *in vivo* auslösen können (Kolesaric et al. 1997), wobei MHC I-defiziente dendritische Zellen die DTH-Reaktion signifikant verringern (Krasteva et al. 1998).

Für *mucd4*⁻ und CD8-defiziente Mäuse berichten Wang et al. (2000) eine im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen stark verringerte Oxazolone-DTH. Die Autoren wiesen sowohl für *mucd4*⁺ als auch für CD8⁺ T-Zellen die Produktion von IFN- γ nach und schlossen auf vergleichbare Effektorfunktion für CD4⁺ TH-Zellen und CD8⁺ T-Zellen. Die Identifizierung IL-4 sezernierender T-Zellklone in DNFB-sensibilisierten Mäusen zeigt, dass bei der Sensibilisierung offensichtlich nicht nur eine TH1-polarisierte, sondern eine heterogene funktionelle T-Zell-Antwort induziert werden kann (Fehr et al. 1994).

Höchstwahrscheinlich werden Dauer und Ausprägung der DTH von spezifischen regulatorischen TH-Zellen begrenzt. Diese Zellen weisen eine hohe CD25-Expression auf und limitieren die Expansion haptenspezifischer,

γ -Interferon-sezernierender CD8⁺ T-Zellen. (Gorbachev und Fairchild 2004, Dubois et al. 2003, Kish et al. 2005 und 2007).

1.2 Experimentelle Anwendung monoklonaler anti-CD4-Antikörper

TH-Zellen exprimieren CD4, ein Glykoprotein, dass an der Oberfläche dieser zu finden ist. Dieses Oberflächenmolekül nimmt an der Interaktion zwischen T-Zell-Rezeptor und dem Komplex aus Antigen und MHC II über die Bindung an die nicht polymorphe Region des MHC II-Moleküls teil. Die CD4 – MHC II-Interaktion resultiert in einer erhöhten interzellulären Adhäsion und intrazellulären Signalen, welche für die T-Zell Entwicklung und die Antigenerkennung durch T-Zellen erforderlich sind (Ravichandran et al. 1996, Killeen und Littman 1996, Leahy 1995, Carrel et al. 1989, 1991). Zusätzlich konnten verschiedene Arbeitsgruppen zeigen, dass es selbst in der Lage zur Signaltransduktion ist (Leahy 1995, Carrel et al. 1988, 1991). Als die Bedeutung der CD4⁺ TH-Zelle für die Induktion und Regulation von verschiedenen Immunantworten erkannt war, wurde sie und insbesondere das CD4 Molekül zum Ziel intensiver Forschung. So wurden monoklonale Antikörper entwickelt, welche gegen das CD4-Molekül gerichtet waren. Damit wurde versucht, die Funktion der TH-Zellen und den Verlauf von Immunantworten zu beeinflussen. Für verschiedene Antikörper konnten dabei unterschiedliche Wirkungen gezeigt werden. So ist für einige beschrieben, dass sie die Zahl der CD4⁺ TH-Zellen im Peripherblut reduzieren können (Cobbald et al. 1984, Wofsy et al. 1985, Benjamin et al. 1986, Waldmann et al. 1989, 1998). Zum Anderen erkannte man neben diesem als Depletion bezeichneten Vorgang, dass anti-CD4-mAk teilweise in der Lage sind, eine verminderte CD4-Expression oder Downmodulation zu induzieren. Es wird angenommen, dass diese Mechanismen die Grundlage einer anti-CD4-mAk vermittelten Immunsuppression sind. Mittels dieser mAk ließ sich an Mäusen Toleranz und ein Zustand der Anergie gegen körperfremdes Protein erzeugen (Qin et al. 1987; Carteron et al., 1988). Sie wurden bei experimentellen Transplantationen zur Verminderung früher (durch immunsuppressive Effekte) und später (durch Toleranzinduktion) Abstoßungsreaktionen eingesetzt. So konnte nach experimenteller Herztransplantation mittels Behandlung verschiedener mAk eine Abstoßungsreaktion verhindert, Toleranz induziert und damit eine verlängerte

Lebensdauer erreicht werden (Scully et al. 1994; Yin et al. 1995, Roelen et al. 1998). Auch bei Nierentransplantationen (Motoyama et al. 2000) und Hauttransplantationen (Lehmann et al. 1992) konnten Erfolge verzeichnet werden. Im Menschen wurden mAk zur Therapie chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (Emmrich J. et al. 1991, 1995) sowie zur Behandlung der Rheumatoidarthritis (Emmrich, F. et al. 1991; Chen et al., 1996; Saitovitch et al. 1996; Lehmann et al. 1997; Orosz et al. 1997; Wendling et al. 1998) eingesetzt. Winsor-Hines et al. (2004) belegten an Pavianen erneut, dass sich durch die Anwendung monoklonaler anti-CD4-Antikörper, unter gleichzeitiger Applikation eines Antigens, eine immunologische Toleranz erzeugen lässt, beziehungsweise nur eine stark verminderte Immunantwort als Reaktion auf ein appliziertes Antigen auslösen lässt. Winsor-Hines et al. verwendeten einen nicht depletierenden anti-CD4-mAk. Der eingesetzte humanisierte Antikörper besaß eine veränderte Fc-Region, mit der Intention eine Fc-vermittelte komplementabhängige Depletion zu minimieren. Auch konnte in Tiermodellen von Rheumatoid Arthritis (Chu und Londei 1996, Mauri et al. 1997), Multipler Sklerose (Biasi et al. 1997), Typ-1-Diabetes mellitus (Hutchings et al. 1992) und systemischem Lupus erythematoses (Wofsy und Seaman 1985) durch eine Behandlung mit CD4 spezifischen monoklonalen Antikörpern, welche nicht depletierend waren, ein Fortschreiten der Erkrankung verhindert werden.

Des Weiteren beschrieben Janeway et al. (1989) unterschiedliche Effekte von monoklonalen Antikörpern, welche gegen das CD4-Molekül gerichtet sind. So konnten Einflüsse auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration und auch Änderungen des Phosphorylierungszustandes intrazellulärer Moleküle beobachtet werden, wobei ein Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration und eine Steigerung der IL-2 Produktion als aktivierende Effekte interpretiert werden können (Carrel et al. 1991). Für den anti-*hu*CD4-mAk MAX16H5 ist nach Kreuzvernetzung ein Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration in monozytoiden Zellen beschrieben (Guse et al. 1992, 1993). Auch konnte für eine Reihe von anderen anti-CD4-mAk gezeigt werden, dass sie in der Lage sind, CD4+ TH-Zellen so zu verändern, dass diese nach Stimulation des T-Zell Rezeptors apoptotisch werden (Newell et al. 1990, Tamma et al. 1997). Mehrere Autoren beschreiben eine Abhängigkeit zwischen dem durch den mAk erkannten Epitop des CD4-Moleküls, an dem die mAk binden, und der dadurch verursachten Wirkung auf die CD4+ TH-Zelle (Baldari et al. 1995, DiSomma et al. 1995, Milia et al. 1997). Darüber hinaus konnten Horneff et al. (1993)

für den mAk MAX16H5 eine Modulationsfähigkeit zeigen, welche abhängig vom Fc-Teil des mAk ist. Auch konnte ein Zusammenhang zwischen dem Isotyp des mAk und der bevorzugten Immunantwort (TH1 oder TH2) nachgewiesen werden (van Cleave et al. 1995).

1.3 Das humane CD4/DR3 mehrfach transgene Mausmodell

Wegen der Strukturunterschiede zwischen menschlichem und murinem CD4, ist es nicht möglich, einen anti-*hu*CD4-Antikörper in einem Mausmodell zu untersuchen. Ein Ausweg aus dieser problematischen Situation ist die Nutzung transgener Versuchstiere. Es sind Tiere beschrieben, welche *hu*CD4 an Stelle des *mucd4* Moleküls exprimieren (Killeen et. al. 1993, Mak et. al. 1992, Hanna et. al. 1994, Blum et. al. 1993). Da jedoch *hu*CD4 nur mit den Molekülen des menschlichen MHC II-Komplexes interagieren kann, wurde zusätzlich eine häufig vorkommende Variante des humanen MHC II-Komplexes, nämlich HLA-DR3, eingebracht. Die Entwicklung dieser *hu*CD4+DR3+*mucd4*- Mäuse ist bei Laub et. al. 2000 beschrieben. Diese Tiere wurden daraufhin auf die Zusammensetzung ihres THZ-Kompartiments untersucht. Es zeigte sich, dass diese Mäuse sowohl *hu*CD4+ als auch *mu*CD8+ TZ besitzen (Laub et. al. 2000). Zusätzlich exprimieren antigenpräsentierende Zellen, wie dendritische Zellen oder Monozyten/Makrophagen, das *hu*CD4 Molekül, sodass das Verteilungsmuster von *hu*CD4 der transgenen Tiere sehr dem menschlichen ähnelt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Expression von HLA-DR3 in den Mäusen ähnlich der von murinem MHC II ist. Laub et al. zeigten auch, dass diese transgenen Mäuse zur Ausbildung humoraler Immunantworten gegen Tetanustoxoid befähigt sind (Laub et. al. 2002). Dadurch ergibt sich mittels dieser Versuchstiere die Gelegenheit, anti-*hu*CD4-Antikörper vor ihrem Einsatz in der humanen Therapie in einem transgenen Mausmodell intensiv zu studieren.

1.4 Beeinflussung der DTH durch anti CD4 Behandlung

Wie Autoimmunerkrankungen, bei denen eine anti-CD4-Therapie Wirksamkeit zeigen konnte (Rheumatoid Arthritis, Multiple Sklerose, Diabetes mellitus Typ 1, systemischer Lupus erythematoses), ist die Kontaktallergie eine zellvermittelte TH1-Antwort. Das legt die Vermutung nahe, dass auch diese sich durch eine anti-CD4-Behandlung beeinflussen lässt. Verschiedene Autoren beschreiben dies mit unterschiedlichem Erfolg. So konnten Miller und Jenkins (1985) mittels Applikation eines depletierenden anti-CD4-mAk während der Sensibilisierungs- und der Auslösungsphase die murine DTH-Reaktion gegen DNFB signifikant reduzieren, wobei die Behandlung während der afferenten Phase einen stärkeren Effekt erzielte. Podolin et al. (2000) beschrieben eine reduzierte DTH-Reaktion gegen Oxazolon, mit geringerer Gewebsschwellung und niedrigerem IFN- γ Level, bei Injektion eines depletierenden oder eines nicht-depletierenden mAk direkt vor der Sensibilisierung. Jedoch hatte eine Behandlung mit den gleichen mAk während der Auslösungsphase keinen Einfluss auf die Ausprägung der DTH-Reaktion. Im Gegensatz dazu beschreiben verschiedene Autoren, welche unterschiedliche depletierende anti-CD4-mAk vor Sensibilisierung der Mäuse gegen Oxazolon oder DNFB verwendeten, eine verstärkte und verlängerte Kontaktallergie (Gocinski und Tigelaar 1990, Xu et al. 1996, Xu et al. 1997, Akiba et al. 2002, Gorbachev und Fairchild 2004).

1.5 Zielstellung der Arbeit

In tierexperimentellen Modellen ist gezeigt worden, dass mit ausgewählten Antikörpern gegen *mucd4* zelluläre Immunreaktionen beeinflusst werden können. Diese Möglichkeit könnte einen attraktiven therapeutischen Ansatz für humane Immunerkrankungen darstellen. Zwischen *huCD4* und dem *mucd4* in Tiermodellen besteht aber nur eine begrenzte strukturelle Übereinstimmung. Solche mAk, mit denen experimentelle Krankheitsmodelle erfolgreich behandelt werden können, haben für eine humane Immuntherapie allerdings keine Bedeutung. Da die funktionelle Beeinflussung von dem erkannten Epitop am CD4 Molekül abhängt, ist eine *in vivo*-Auswahl bzw. Charakterisierung erfolgversprechender mAk über die

Speziesgrenzen hinweg nicht möglich. Mit dem *huCD4/DR3*-Mausmodell würde erstmalig die Möglichkeit bestehen, verschiedene mAk gegen humanes CD4 innerhalb eines intakten Organismus zu untersuchen. Voraussetzung dafür ist ein stabiles reproduzierbares Modell für eine zellvermittelte Immunreaktion.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war, den Einfluss der monoklonalen anti-*huCD4*-Ak MAX16H5 und MAX12F6 zu untersuchen und deren jeweiliges Potenzial für eine humane Anwendung zu erfassen. Dazu sollte eine Immunreaktion vom verzögerten Typ (Delayed type hypersensitivity, DTH) im *huCD4/HLA DR3*-transgenen Mausmodell etabliert werden. Die potenziellen Möglichkeiten der beiden mAk zur Einflussnahme auf Sensibilisierung und Auslösung einer DTH sollten untersucht und vergleichend bewertet werden. Darüber hinaus sollte die funktionelle Rolle der CD4⁺ TH-Zellen für die Induktion einer DTH mittels CD4 KO, MHC II KO und CD4 KO/MHC II KO Mäusen dargestellt werden. Des Weiteren wurden die Auswirkungen einer experimentellen anti-*huCD4*-Therapie auf zirkulierende TH-Lymphozyten untersucht. Auch sollte versucht werden, eine chronische Entzündung mittels ¹¹¹In markierter F(ab)- und F(ab')₂-Fragmente darzustellen oder zu detektieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere und deren Haltung

2.1.1.1 Tierhaltung

Die Haltung der Mäuse erfolgte in Käfigen mit maximal 4 Tieren. Sie wurden unter Barrierebedingungen gehalten, d.h. sie waren keinen infektiösen oder immunogenen Expositionen ausgesetzt.

Alle Eingriffe, wie z.B. Blutentnahmen, Ak-Injektionen und DNFB Behandlung erfolgten unter keimarmen Bedingungen. Für die Aufbereitung der gewonnenen Proben wurden gammabestrahlte Kunststoffmaterialien sowie sterile Medien (Puffer) und Zusätze (fluoreszenzmarkierte Detektionsantikörper) verwendet. Alle Tierexperimente wurden unter Einhaltung der entsprechenden Richtlinien durchgeführt.

2.1.1.2 Transgene Mäuse

HuCD4/DR3 Mäuse exprimieren menschliches *huCD4* und HLA-DR17, eine Variante des HLA-DR3-Moleküls, bei gleichzeitigem murinem *cd4* defizientem Hintergrund (*mucd4* KO). Sie entstammen dem tierwissenschaftlichen Labor der medizinischen Fakultät Hannover. Dazu wurden TgN(HLA-DR17 α/β)1Dkfz- und TgN(hCD4)1Lit-cd4tm1Lit-Mäuse gekreuzt und die Tiere mit *huCD4/HLA-DR17*-Expression separiert. Aus diesen Foundern erfolgte die Nachzucht der Tiere mit dem gesuchten Genotyp. Die HLA-DR3 transgenen Tiere wurden erzeugt unter Benutzung eines 6 kb Nde Fragments eines HLA-DRA Klonen in pUC13 und einem 24 kB Cla I x Sal I-Fragments des cos 4.1, welcher das β -Gen von DRB1*0301 enthält. Die transgene CD4-Expression wurde erzielt durch die Kombination eines Genombausteins der murinen *cd4*-Enhancerregion und eines humanen CD4-Minigens, das alle codierenden Exons und eine ca. 3 kb große Sequenz der CD4-Promoter-Region enthält (Meyer et al. 1997). Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten *huCD4/DR3*

Mäuse entstammten der achten bis elften Generation nach initialer Kreuzung HLA-DR3 und *huCD4* transgener Mäuse. Insgesamt wurden 105 *huCD4/DR3* transgene Tiere verwendet.

Neben *huCD4/DR3* transgenen Tieren wurden auch *huCD4/DR3-/mucd4-* transgene Mäuse (kurz: MHC II KO; DR3-) verwendet, diese entstanden als Segreganten während der Nachzüchtung. Da der natürliche Ligand des CD4 Moleküls, das MHC II, in diesen Tieren nicht exprimiert wird, ist der Aktivierungsweg der CD4+ TH-Zellen in diesem Modell empfindlich gestört. Innerhalb der Versuche wurden 15 *huCD4+/DR3-/mucd4-* transgene Mäusen verwendet.

Des Weiteren entstanden als Segreganten während der Züchtung *huCD4-/DR3+/mucd4-* transgene Mäuse (kurz: CD4 KO; *huCD4-*). In diesen Mäusen wird zwar der natürliche Ligand HLA-DR3, jedoch das CD4 Molekül selbst nicht exprimiert. Somit ist der Aktivierungsweg der THZ an einer anderen Stelle gestört. Es fanden für die Untersuchungen 15 *huCD4-/DR3+/mucd4-* transgene Mäuse Verwendung.

Darüber hinaus entstand während der Nachzüchtung eine *huCD4-/DR3-/mucd4-* transgene Maus (kurz: CD4 KO/ MHC II KO; *huCD4-/DR3-*). Dieses Tier ist weder in der Lage das *huCD4* noch das HLA-DR3 Molekül an der Oberfläche zu exprimieren.

2.1.1.3 Kontrolltiere

Neben den transgenen Mäusen wurden sogenannte Wildtyp-Mäuse verwendet, um eine Vergleichbarkeit der DTH-Reaktion in *huCD4/DR3* tripel transgenen Tieren zu zeigen. Hier wurden C57/BL6-Mäuse und Balb/c-Mäuse als Kontrolltiere verwendet. Diese Inzuchtstämme sind heute im Rahmen von Forschungen im Tiermodell weit verbreitet.

2.1.2 Verwendete Antikörper

2.1.2.1 Monoklonale Antikörper für zelluläre Analysen

Bezeichnung	Klon	Isotyp	Markierung	Quelle
Anti-human CD4	MAX16H5	mIgG1	FITC	R. Laub et al.
Anti-human CD4	MAX12F6	mIgG2a	FITC	R. Laub et al.
Anti-human HLA-DR3	L243	mIgG2a	Cy-Chrome	Pharmingen
Anti-maus CD3	145-2C11	hIgG	APC	Pharmingen
Anti-maus CD8	CT-CD8b	rlgG2a	PE	Caltag
Anti-maus CD25	7D4	rlgM	Biotin	Pharmingen
Anti-maus CD62L	MEL-14	rlgG2a	FITC	Pharmingen
Anti-maus pan NK	DX5	rlgM	PE	Pharmingen
Anti-mIgG1	A85-1	rlgG1	Biotin	Pharmingen
Anti-mIgG2a	R19-15	rlgG1	Biotin	Pharmingen

Tab. 1: Spezifische monoklonale Antikörper

Bezeichnung	Klon	Isotyp	Markierung	Quelle
Maus-IgG1-Kontroll-Ig	MOPC 21	mIgG1	-	Sigma
Maus-IgG2a-Kontroll-Ig	UPC10	mIgG2a	-	Sigma
Maus-IgG1-Isotyp-Kontroll-Ig	DAK-G01	mIgG1	Cy-Chrome	DAKO
Maus-IgG2a-Isotyp-Kontroll-Ig		mIgG2a	FITC	Caltag
Ratte-IgG2a-Isotyp-Kontroll-Ig		rlgG2a	PE	Caltag
Ratte-IgM-Isotyp-Kontroll-Ig		rlgM	PE	Pharmingen
Hamster-IgG		hIgG	FITC	Caltag

Tab. 2: Unspezifische monoklonale Isotyp-Kontroll-Antikörper

2.1.2.2 anti-*hu*CD4-Antikörper zur experimentellen Therapie

In der vorliegenden Arbeit wurden die beiden monoklonalen anti-*hu*CD4-Antikörper MAX16H5 und MAX12F6 eingesetzt. Diese wurden durch Immunisierung weiblicher Balb/c Mäuse mit Zellen des humanen THZ-Klons 2C11 und Fusionierung von Milzzellen dieser Tiere mit X63.Ag8.653 Myelomazellen erzeugt.

Der Isotyp von MAX16H5 wurde mit mIgG1 bestimmt (Emmrich et al. 1983,1986). Die für die Herstellung erforderlichen Hybridomzellen sind bei der European Collection of Cell Cultures ECACC unter der Nummer 88050502 hinterlegt. Aus dem kompletten Antikörper MAX16H5 wurden durch proteolytische Spaltung und chromatographische Aufreinigung F(ab)- und F(ab')₂-Fragmente gewonnen. Komplette Ak sowie F(ab)- und F(ab')₂-Fragmente wurden durch das Institut für klinische Immunologie und Transfusionsmedizin (IKIT) der Universität Leipzig hergestellt. Der komplette Ak wurde in einer Konzentration von jeweils 1 mg/ml PBS zur i. p. Injektion verwendet.

MAX12F6 wurde ebenfalls durch das IKIT der Universität Leipzig bereitgestellt. MAX12F6 wurde als IgG2a-Isotyp bestimmt. Auch MAX12F6 wurde in einer Konzentration von 1mg/ml PBS zur Injektionen verwendet.

2.1.3 Reagenzien

2,4-Dinitrofluorobenzen (DNFB, Sangers Reagenz)	Sigma
4-Nitrophenyphosphat	Bioproducts, Heidelberg
Aceton	DOMO Caproleuna
Diethanolamin	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O)	Roth, Karlsruhe
ExtrAvidin® - Alkalische Phosphatase	Sigma, Deisenhofen
FACS Clean	Becton Dickinson
FACS Flow	Becton Dickinson
FACS Rinse	Becton Dickinson
Fetales Kälberserum (FKS)	Calbiochem, Bad Soden
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck
Lysing Solution (Formaldehyd enthaltend)	Becton Dickinson
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Olivenöl	Egesie

Rompun 2 %	Bayer
Salzsäure (HCl)	Merck
Streptavidin Tricolor, Cy-Chrome	Caltag
Trypanblau	Bioproducts
Tween 20	Bioproducts
Velonarcon 0,5	Berlin-Chemie

2.1.4 Pufferlösungen

Diethanolamin-Puffer: 97 ml Diethanolamin
13ml HCl
0,1 g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$
0,1 ml 10%iges NaN_3

FACS-Lysepuffer: Lysing Solution 10 ml
ad 90 ml Aqua bidest.

FACS-Waschpuffer: 1 % FCS
0,1 % NaN_3
ad 1000 ml PBS

NaHCO_3 -Puffer (0,1 M): 0,42 g NaHCO_3
ad 100ml Aqua bidest

PBS: 137 mM NaCl
8,1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
2,7 mM KCl
1,5 mM KH_2PO_4
ad 1000 ml Aqua bidest pH = 7,4

PBS-Tween: 0,5 ml Tween 20

2.1.5 Geräte

Außentaster	Oditest	Kroeplin GmbH, Schlüchtern
Durchflusszytometer	FACSCalibur	Becton Dickinson
ELISA-Reader	Rainbow	SLT Labinstruments
Gasbrenner	Gasi	Schütt
Gefrierschränke	-20° C	Liebherr
	-70° C	Revco
Kleintierrasierer	Favorita II	Aesculap
Kühlschränke	4° C	Liebherr
Mikroskope	Axiovert 25	Zeiss
	Standard 20	Zeiss
	Telaval 31	Zeiss
pH-Meter	pH 323	WWT
Pipetten	P10	Eppendorf
	P20, P100, P200, P1000	Gilson
Sterilwerkbank	HERA safe	Heraeus
Schüttler	MTS2	Janke & Kunkel
	MS1	Janke & Kunkel
	Vortex Genie 2	Bender & Hobein
Stickstofflagerbehälter	GT 100	Air Liquide
Waagen	Analysenwaage	Faust
	Präzisionswaage K770	Kern
Waschkamm	Immunowash 12	Nunc
Zählkammer Neubauer	Improved	Brand
Zentrifugen	Rotina 48.S	Hettich
	Variofuge 3.0RS	Heraeus
	Zentrifuge 5415C	Eppendorf

2.2 Methoden

2.2.1 Aufbereitung des Kontaktallergens und dessen Trägerlösung

In den hier beschriebenen Versuchen wurde DNFB als Kontaktallergen mit sehr hoher Sensibilisierungspotenz verwendet. Diese Substanz ist auch unter dem Namen Sangers Reagenz bekannt und wird in der biochemischen Forschung und Lehre zur Charakterisierung von Aminen sowie als Zwischenprodukt der Pestizidherstellung eingesetzt. Sie besitzt stark sensibilisierende Eigenschaften, die sowohl beim Menschen, als auch im Tierexperiment nachgewiesen wurden. Für die Sensibilisierung der Versuchstiere wurde eine 0,5% DNFB Lösung und für die Auslösung eine 0,2% DNFB Lösung verwendet. Die Herstellung der verschiedenen Lösungen erfolgte unter keimarmen Bedingungen und für jeden der Versuche frisch. Zunächst wurde eine im Verhältnis 4/1 gemischte Aceton/Olivenöl Lösung hergestellt. Diese diente als Trägerlösung bzw. Vehikel und wurde als solches auch in den Versuchsreihen eingesetzt. Daraufhin wurde bis zu einer Konzentration von 0,5% bzw. bis zu einer Konzentration von 0,2% DNFB zugesetzt.

2.2.2 Sensibilisierung der Versuchstiere gegenüber DNFB

Gemäß den Current Protocols in Immunology 2001 wurde den Versuchstieren zunächst mittels eines Kleintierrasierers, an einem zirka zwei Zentimeter im Durchmesser betragenden Teil des Abdomens, das Bauchfell abrasiert. Daraufhin wurde den Versuchstieren an zwei aufeinander folgenden Tagen, den Tagen 0 und 1 der Behandlung, 20 µl einer 0,5% DNFB Lösung bzw. in einzelnen Versuchen 20 µl der Trägerlösung allein mittels einer Eppendorfpipette auf diese Stelle appliziert. Zur Minimierung einer Kontamination des Käfigs, wurden die Versuchstiere für zirka zehn Sekunden zurückgehalten. Abschließend wurden sie für etwa 5 Minuten in einem separaten Käfig ohne Streu gehalten. Darauf hin ruhten die Tiere bis zum Tag 5 der Behandlung.

2.2.3 Auslösung der DTH

Nach Sensibilisierung und anschließender fünftägiger Ruhephase wurde zirka 30 Minuten vor Behandlung die „Baseline Ohrdicke“ oder Grundohrdicke bestimmt. Dieser Wert wird als „null Stunden“ Wert angegeben. Zur Auslösung der Kontaktallergie wurden die Versuchstiere am rechten Ohr mit 20 µl einer 0,2% DNFB Lösung und zur internen Kontrolle am linken Ohr mit 20 µl der Trägerlösung allein reexponiert. Die Reexposition fand am Tag 5 (**Standardprotokoll**) oder an den Tagen 12, 19, 26 oder 33 statt. Zur sekundären Auslösung wurde diese Prozedur 26 Tage nach dem ersten DNFB Kontakt wiederholt. Auch bei Auslösung wurden, um eine Kontamination des Käfigs zu minimieren, die Versuchstiere zunächst für etwa 10 Sekunden zurückgehalten, und abschließend noch für zirka 5 Minuten in einem separaten Käfig gehalten.

2.2.4 Messung der DTH

Die ausgelöste Kontaktallergie wurde durch Bestimmung der Ohrdicke quantifiziert. Hierzu wurden die Tiere in Bauchlage fixiert. Zur Vermeidung von Messfehlern wurde den Tieren zu den verschiedenen Messzeitpunkten an der gleichen Stelle die Ohrdicke bestimmt. Diese Messungen erfolgten 30 Minuten vor und 12, 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Reexposition (**Standardprotokoll**). In einzelnen Experimenten wurde die Ohrdicke im 24-Stunden-Rhythmus bis 192 Stunden ermittelt. Hierzu verwendet wurde ein Außentaster („Oditest“), ein Präzisionsmessgerät der Firma Kroeplin. Für die einzelnen Messpunkte wurde die Ohrdickenänderung durch Subtraktion der Grundohrdicke vom aktuellen Messwert berechnet.

2.2.5 Applikation der monoklonalen Antikörper

Die verschiedenen mAk wurden gewichtsadaptiert mit 15µg/g Körpergewicht injiziert. Zur Berechnung der individuellen Dosis wurden die Tiere zunächst gewogen. Die Applikation der monoklonalen Antikörper erfolgte dann durch intraperitoneale (i. p.) Injektion. Hierzu wurden die Tiere in Rückenlage fixiert. Nach Desinfektion des

rechten Unterbauches erfolgte nach Einstich und Probeaspiration, zur Lagekontrolle der Kanüle, die sichere Injektion in die Bauchhöhle der Versuchstiere. Von dort wurden die Substanzen über das die Bauchhöhle auskleidende Peritoneum resorbiert.

Um die Auswirkungen der anti-*hu*CD4-Behandlung auf das T-Zell Kompartiment beurteilen zu können, waren Blutentnahmen erforderlich. Dafür wurde den Tieren unter Äthernarkose Blut aus dem retroorbitalen Venenplexus mittels einer heparinisierten Glaskapillare entnommen. Das Blut wurde zur weiteren Verwendung in 500µl-Gefäße überführt. Anschließend wurde das Peripherblut aufgearbeitet und mittels FACS-Analyse hinsichtlich der Zusammensetzung des T-Zell Kompartiments ausgewertet.

2.2.5.1 anti-*hu*CD4-Behandlung während der Sensibilisierungsphase

Für die anti-*hu*CD4-mAk Behandlung während der Sensibilisierungsphase, wurden *hu*CD4/DR3-Tiere mit anti-*hu*CD4-mAk MAX16H5 oder MAX12F6 bzw. deren Isotypkontroll Ak (MOPC21, UPC10) an den Tagen -2, -1 und 0 intraperitoneal injiziert. Die letzte Injektion erfolgte 30 Minuten vor dem ersten Haptenkontakt. Um nur die Auswirkungen der anti-*hu*CD4-Behandlung auf die Sensibilisierungsphase zu überprüfen, musste der immunsupprimierende Effekt abgewartet und die Auslösung der DTH auf einen möglichst späten Zeitpunkt verlegt werden. In Vorexperimenten wurde hierfür der Tag 26 als optimaler Auslösungszeitpunkt ermittelt. Die notwendigen Blutentnahmen erfolgten an den Tagen -10, 1 und 26. In den Isotypkontrollgruppen fanden jeweils 2, in der MAX16H5-Gruppe 7 und in der MAX12F6-Behandlungsgruppe 6 Tiere Verwendung.

2.2.5.2 anti-*hu*CD4-Behandlung während der Auslösungsphase

Für die anti-*hu*CD4-mAk Behandlung mit den Antikörpern MAX16H5 und MAX12F6 während der Auslösungsphase wurden die *hu*CD4/DR3-Mäuse zunächst nach dem oben beschriebenen Standardprotokoll sensibilisiert. Darauf hin wurde den Tieren an den Tagen 5, 6 und 7 gewichtsadaptiert (15 µg/g KG) die aufbereitete

Antikörperlösung injiziert. Die erste Injektion erfolgte eine Stunde vor dem wiederholten Haptenkontakt (Auslösung der Kontaktallergie). Zusätzlich wurden als Isotypkontroll Ak MOPC21 und UPC10 appliziert. Die erforderlichen Blutentnahmen erfolgten an den Tagen -10, 8 und 26. In den Isotypkontrollgruppen fanden jeweils 2, in der MAX16H5-Gruppe 7 und in der MAX12F6-Behandlungsgruppe 6 Tiere Verwendung.

2.2.6 Narkotisierung der Versuchstiere

Für die Blutentnahmen aus dem Retroorbitalplexus wurden die Versuchstiere in eine Äthernarkose versetzt. Dazu wurde zunächst ein Wattebausch mit Äther getränkt und in ein geschlossenes Glasgefäß gelegt. Daraufhin wurden die Versuchstiere einzeln in das Glasgefäß verbracht. Die Maßnahme konnte nach Narkotisierung ungehindert durchgeführt werden. Die Narkose der Versuchstiere hielt für 1 bis 2 Minuten an.

Für Injektionen in die Schwanzvene oder Szintigraphien wurden die Tiere in eine Velonarcon/Rompun Narkose versetzt. Hierzu wurde zunächst ein 5/1 Gemisch aus PBS und Velonarcon 0,5 (50 mg/ml Ketamin) hergestellt. Diesem wurden kurz vor Injektion 10 Vol. % Rompun (2 % Xylazin) zugesetzt. Daraufhin erfolgte die intraperitoneale Applikation von 10 µl/g KG dieser Lösung. Die narkotisierende Wirkung setzte ca. 1-3 Minuten nach Applikation ein und hielt für 90 bis 120 Minuten an.

2.2.7 Bildgebung für die THZ-Kompartimente (Immunszintigraphie)

2.2.7.1 Markierung von MAX16H5 F(ab)- und F(ab')₂-Fragmenten mit ¹¹¹In

Aus dem kompletten mAk MAX16H5 wurden durch proteolytische Spaltung und chromatographische Aufreinigung F(ab)- und F(ab')₂-Fragmente gewonnen. Diese Fragmente wurden durch die Klinik für Nuklearmedizin der Universität Leipzig mit ¹¹¹In konjugiert und zur Injektion aufbereitet.

2.2.7.2 Injektion der ^{111}In -markierten anti-*hu*CD4-Fragmente

Zur Detektion einer Entzündungsreaktion wurde sensibilisierten Versuchstieren 15 μCi des ^{111}In konjugierten F(ab)- und F(ab')₂-Fragmente intravenös (i. v.) in die Schwanzvene injiziert. Daraufhin wurde von den Tieren eine 0 h Aufnahme mittels Szintigraphie gemacht. Direkt im Anschluss wurde eine Kontaktallergie mittels 0,2 % DNFB Lösung am rechten Ohr ausgelöst. Als interne Kontrolle diente das linke Ohr der Tiere, welches nur mit der Trägerlösung behandelt wurde. Zu den Zeitpunkten 24, 48, 72 und 96 h nach Auslösung erfolgten die Messungen der Ohrdicken und eine szintigraphische Aufnahme der Mäuse. Innerhalb dieser Versuche fanden 8 *hu*CD4/DR3 und 3 CD4 KO Mäuse Verwendung.

2.2.7.3 Bildgebung von THZ Kompartimenten mit der Gamma Kamera (Szintigraphie)

Nach erfolgter Narkotisierung mittels Velonarcon/Rompun und Injektion der ^{111}In markierten F(ab)- und F(ab')₂-Fragmente wurden die Versuchstiere in Bauchlage fixiert. Daraufhin erfolgte mittels Szintigraphie direkt vor der Auslösung einer Kontaktallergie gegen DNFB eine Aufnahme zur Aktivitätsmessung. Diese Prozedur wurde für die Messzeitpunkte 24, 48, 72 und 96 h nach Auslösung wiederholt. Mittels der so erhaltenen Daten konnte die Verteilung der ^{111}In konjugierten F(ab)- und F(ab')₂-Fragmente von MAX16H5 im Zeitverlauf der DTH bestimmt werden.

2.2.7.4 Nachweis pathologischer THZ Anreicherungen im Gamma Counter

Nach letztmaliger szintigraphischer Aufnahme und Messung der Ohrdicke (96 h nach Auslösung) wurden die Versuchstiere euthanasiert. Die rechten und linken Ohren wurden asserviert. Die so gewonnenen Ohren wurden mit dem Szintillationszähler hinsichtlich ihrer Strahlungsaktivität untersucht. Mittels der so gewonnenen Daten konnte die Anreicherung der markierten F(ab)- und F(ab')₂-Fragmente quantifiziert werden.

2.2.8 Durchflusszytometrische Analysen

2.2.8.1 Messprinzip

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die simultane Analyse einzelner Zellen hinsichtlich verschiedener Parameter, wie Zellgröße und Granularität. Darüber hinaus kann die Expression extrazellulärer Membranmoleküle, sowie intrazellulärer Moleküle mit Hilfe von Antikörpern, die an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind, bestimmt werden. Bei der Durchflusszytometrie werden vorher in Einzelzellsuspension gebrachte Zellen durch eine Kapillare gedrückt und an einem Argon-Laserstrahl und einer weiteren Laserdiode vorbeigeleitet. Sensible Photodetektoren messen sowohl das gestreute, als auch das emittierte Licht. Dabei korreliert die Vorwärts-Lichtstreuung (forward scatter, FSC) mit der Größe der Zellen, dagegen stellt die seitliche Lichtstreuung (side scatter, SSC) ein Maß für die Granularität bzw. die Kern/Plasma-Relation der Zellen dar. Größe und Granularität sind für verschiedene Zelltypen (Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten) spezifisch. Das emittierte Licht wird durch Detektoren, denen optische Filter vorgeschaltet sind, bestimmt. Neben Größe und Granularität ist eine weitere Zelldifferenzierung durch Nutzung von Fluoreszenzfarbstoffen möglich. Während drei verschiedenfarbige Fluoreszenzen (FL1-FL3) nach Anregung durch einen Argonlaser bei 488 nm erzeugt werden, ermöglicht eine weitere Laserdiode, die Licht mit einer Wellenlänge von 635 nm emittiert, die Messung einer vierten Fluoreszenz (FL4). Bei den durchgeführten Untersuchungen kam das Gerät FACSCalibur, welches vier verschiedene Floreszenzen erkennen kann, zum Einsatz. Der Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) besitzt ein Absorptionsspektrum bei 495 nm und strahlt nach Anregung bei 488 nm energieärmeres Fluoreszenzlicht mit einem Emissionsmaximum bei 525 nm aus, welches als Grünfluoreszenz im FL1-Detektor gemessen wird. Phycoerythrin (PE), ein photosynthetisches Pigment aus Rotalgen, weist dagegen ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 564 nm auf. Es strahlt nach Anregung bei 488 nm Fluoreszenzlicht mit einem Emissionsmaximum bei 576 nm aus, das als Orangerotfluoreszenz im FL2-Detektor analysiert werden kann. Der Fluoreszenzfarbstoff Cy-Chrome ist ein kombinierter Farbstoff, welcher als Grundgerüst ebenfalls PE besitzt, woran aber zusätzlich Zyanfarbstoffe gekoppelt sind. Nach Anregung bei 488 nm emittiert er violettes Licht mit einer Wellenlänge von

670 nm, das durch den FL3-Detektor registriert werden kann. Des Weiteren wurde noch ein weiterer Farbstoff das Allophycocyanin (APC) genutzt. Nach Absorption und Anregung strahlt es blaues Licht mit einer Wellenlänge oberhalb von 800 nm aus und wird als 4. Fluoreszenz gemessen. Die Fluoreszenzintensität korreliert dabei mit der entsprechenden Antigendichte auf der Zelloberfläche. Die Messungen und Analysen der gefärbten Zellen erfolgten an FACSCalibur unter der Verwendung der CellQuest-Software (Becton Dickinson). Entsprechend der Vorwärts- und Seitwärtsstreuung für B-Zellen sowie der Seitwärtsstreuung und der CD3-Expression für T-Zellen wurden Analysefenster für Lymphozyten gesetzt. Der Schwellenwert wurde so gewählt, dass Zelltrümmer ausgeschlossen werden konnten. Zur Kompensation der überlappenden Spektren bei den durchgeführten Mehrfachfärbungen dienten einfach gefärbte Proben (FITC, PE, Cy-Chrome, APC). Die Spezifität der gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurde mit Isotyp-Kontroll-Ak gesichert. Entsprechend der Isotyp-Kontrollen wurden Quadranten gesetzt und 5000 Zellen, welche die Kriterien des Analysefensters erfüllten, untersucht. Die Zahl der gefärbten Zellen sowie ihre mittlere Fluoreszenzintensität wurden über eine Quadranten-Statistik der erstellten Punktwolken unter Verwendung der CellQuest-Software ermittelt.

2.2.8.2 Phänotypisierung zirkulierender Lymphozyten

An den verschiedenen Messzeitpunkten wurden je 75 µl Vollblut der Versuchstiere gewonnen, mit jeweils 5 µl Liquemin heparinisiert und mit 2 µl Fc-Rezeptor blockierendem Polyglobulin für mindestens 30 min bei Raumtemperatur vorinkubiert. Die direkt markierten sowie die biotinylierten Antikörper wurden in Röhrchen vorgelegt und mit je 20 µl des heparinisierten Vollbluts 30 min bei Raumtemperatur dunkel inkubiert. Nach Ablauf der Einwirkungszeit erfolgte die Lyse der Erythrozyten durch Zugabe von 1,5 ml Lysepuffer für 10 min bei 4°C in Dunkelheit. Nach dreimaligem Waschen mit FACS-Waschpuffer wurden die Zellen in 250 µl PBS / 1% FCS / 0,1 % NaN₃ aufgenommen und bis zur Messung im FACSCalibur bei 4°C dunkel aufbewahrt. Dies wird als direkte Immunfluoreszenz bezeichnet. Bei Verwendung nicht fluoreszenzmarkierter biotinylierter Primär- oder Sekundärantikörper (anti-CD25, anti-mIgG1, anti-mIgG2a), wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen zur Entfernung nicht gebundener Ak, mit Streptavidin erneut

für 40 min bei 4°C in Dunkelheit inkubiert. Die indirekte Immunfluoreszenz ermöglicht den Nachweis schwach exprimierter Antigene, da am Primär-Ak mehrere Moleküle des farbintensiven Streptavidins binden können. Zur Untersuchung der *in vivo* *hu*CD4-Modulation und der TH-Zell Depletion wurden die Zellen der Tiere, die mit MAX16H5 behandelt wurden mit FITC konjugiertem MAX12F6 dargestellt, während CD4+ TH-Zellen der mit MAX12F6 behandelten Tiere mit FITC konjugiertem MAX16H5 identifiziert wurden. Da diese Antikörper verschiedene Epitope erkennen, entfallen kompetitive Mechanismen, welche die Bestimmung beeinträchtigen könnten.

2.2.9 Berechnung und Statistik

Die am Ohr der Versuchstiere ausgelöste Kontaktallergie wurde durch Bestimmung der Ohrdicke quantifiziert. Zunächst wurde vor Auslösung der Kontaktallergie die Grundohrdicke bestimmt. Zur Berechnung der Ohrdickenänderung wurde die Grundohrdicke für jedes einzelne Ohr von der im Messzeitraum bestimmten Ohrdicke subtrahiert. Die so gewonnen Daten wurden gruppenweise für jeden Messzeitpunkt gemittelt und die Standardabweichung berechnet. Die im Messzeitraum größte gruppenweise gemittelte Ohrdickenänderung wird als maximale Ohrdickenänderung bezeichnet. Im Rahmen eines Experimentes wurde die mittlere Ohrdickenänderung eines Ohres über den gesamten Messzeitraum berechnet und wird als durchschnittliche Ohrdickenänderung bezeichnet.

Zur statistischen Feststellung von Unterschieden der gemittelten Ohrdicken, Ohrdickenänderung bzw. durchschnittlichen Ohrdickenänderung wurde ein zweiseitiger t-Test nach Student verwendet. Es wurde für den rechts – links Vergleich ein t-Test für gepaarte Beobachtungen und für den Vergleich verschiedener Behandlungsgruppen ein t-Test für ungepaarte Beobachtungen verwendet. Zum Nachweis der Robustheit der Messmethode (Messwerte zweier Experimentatoren) wurde im Rahmen eines Experimentes eine Regressionsanalyse durchgeführt. Es wurde eine Regressionsgerade und der zugehörige Regressionskoeffizient bestimmt.

Innerhalb der anti-*hu*CD4-mAk Therapie wurde das T-Zellkompartiment mittels Flowzytometrie analysiert. Zunächst wurde den Tieren 10 Tage vor Behandlung

Peripherblut aus dem Retroorbitalplexus entnommen und hinsichtlich verschiedener Oberflächenmarker analysiert. Dieser für jeden Oberflächenmarker individuell ermittelte Wert wurde mit 100% gleichgesetzt. Die in den beiden weiteren Analysen bestimmten Werte wurden für jedes Versuchstier prozentual auf den Ausgangswert (100%) bezogen. Daraufhin wurden die so ermittelten Daten nach Behandlungsgruppen gemittelt und die Standardabweichung bestimmt.

3 Ergebnisse

3.1 In allen Versuchstieren kann eine spezifische DTH gegen DNFB induziert werden

3.1.1 Das Verfahren zur Ohrdickenmessung ist sicher und reproduzierbar

Zu Beginn der tierexperimentellen Untersuchungen wurde die Zuverlässigkeit der Meßmethode zur Bestimmung der Ohrdicke überprüft. Dazu wurde die Dicke der Ohren von acht unbehandelten *huCD4/DR3*-Mäusen an sieben aufeinanderfolgenden Tagen bestimmt (Außentaster Oditest). Die Tiere waren hinsichtlich Alter, Geschlecht und Gewicht zufällig ausgewählt. An zwei der sieben Messtage erfolgte die Messung „verblindet“, d.h. die Ohrdicke wurde ohne Kenntnis der Mausnummer bzw. der vorher ermittelten Werte bestimmt.

Der Mittelwert dieser sieben Messungen repräsentiert die individuelle Ohrdicke unbehandelter Tiere. Dabei wurden erhebliche Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchstieren festgestellt (**Tab. 3**). Die durchschnittliche Ohrdicke betrug $0,28 \pm 0,15\text{mm}$. Als höchster individueller Wert wurde 0,303mm und als niedrigster individueller Wert 0,257mm ermittelt. Die 7 Einzelmessungen je Tier differierten minimal um 0,01mm und höchstens um 0,05mm. Daraus ergaben sich für die Einzeltiere Standardabweichungen zwischen 0,008 und 0,018mm.

Der maximale Dickenunterschied zwischen rechten und linken Ohr betrug 0,023mm (Tier 3, **Tab. 3**, **Abb. 1**).

Die Robustheit der Messmethode wurde durch zwei Experimentatoren an 17 *huCD4/DR3*-Mäusen nach Induktion einer Kontaktallergie überprüft. Die Ohrdicken wurden an acht aufeinanderfolgenden Tagen von den zwei Experimentatoren unabhängig voneinander vermessen (272 Messungen) und in einem Koordinatensystem gegeneinander aufgetragen (**Abb. 2**). Die errechnete Regressionsgerade wies einen Regressionskoeffizient von $R^2=0,8358$ auf.

Maus Nr.	Ohr	Messung Nr.								
		1	2	3	4	5	6	7	MW	Stabw.
1	rechts	0,25	0,28	0,26	0,26	0,26	0,25	0,24	0,257	0,013
	links	0,29	0,27	0,28	0,28	0,29	0,28	0,27	0,280	0,008
2	rechts	0,26	0,25	0,26	0,25	0,26	0,26	0,26	0,257	0,005
	links	0,28	0,29	0,27	0,26	0,27	0,26	0,26	0,270	0,012
3	rechts	0,26	0,26	0,26	0,27	0,27	0,27	0,28	0,267	0,008
	links	0,28	0,28	0,29	0,28	0,29	0,3	0,31	0,290	0,012
4	rechts	0,28	0,26	0,27	0,27	0,26	0,27	0,26	0,267	0,008
	links	0,25	0,27	0,25	0,25	0,26	0,25	0,26	0,256	0,008
5	rechts	0,31	0,29	0,29	0,28	0,28	0,29	0,32	0,294	0,015
	links	0,3	0,32	0,28	0,29	0,29	0,29	0,3	0,296	0,013
6	rechts	0,3	0,28	0,29	0,28	0,29	0,28	0,29	0,287	0,008
	links	0,32	0,27	0,29	0,27	0,28	0,29	0,27	0,284	0,018
7	rechts	0,28	0,29	0,31	0,28	0,29	0,27	0,29	0,287	0,013
	links	0,26	0,31	0,28	0,29	0,29	0,3	0,3	0,290	0,016
8	rechts	0,32	0,32	0,3	0,29	0,29	0,3	0,3	0,303	0,013
	links	0,3	0,27	0,29	0,28	0,29	0,29	0,3	0,289	0,011

Tab. 3: Die Ohrdickenmessung mittels Außentaster „Oditest“ ist reproduzierbar

Die Ohrdicke von acht unbehandelten *huCD4/DR3*-Mäusen wurde an mehreren Tagen mit oder ohne Kenntnis der Tiernummer (Messung 6 und 7 verblindet) erfasst. Dargestellt sind die Einzelmessungen, deren Mittelwert (MW) sowie die Standardabweichung (Stabw.).

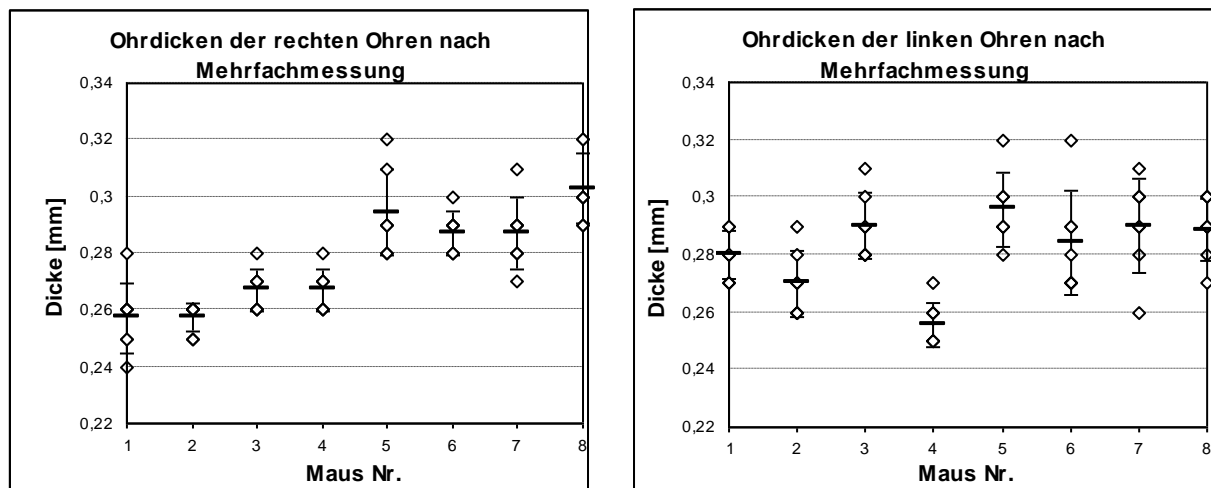


Abb. 1: Ohrdicken variieren interindividuell stärker als intraindividuell

Die Ohrdicke von acht unbehandelten *huCD4/DR3*-Mäusen wurde 7 Mal an verschiedenen Tagen erfasst (2 Mal verblindet). Dargestellt sind die Einzelmessungen (\diamond), deren Mittelwert (—) sowie die Standardabweichung (I).

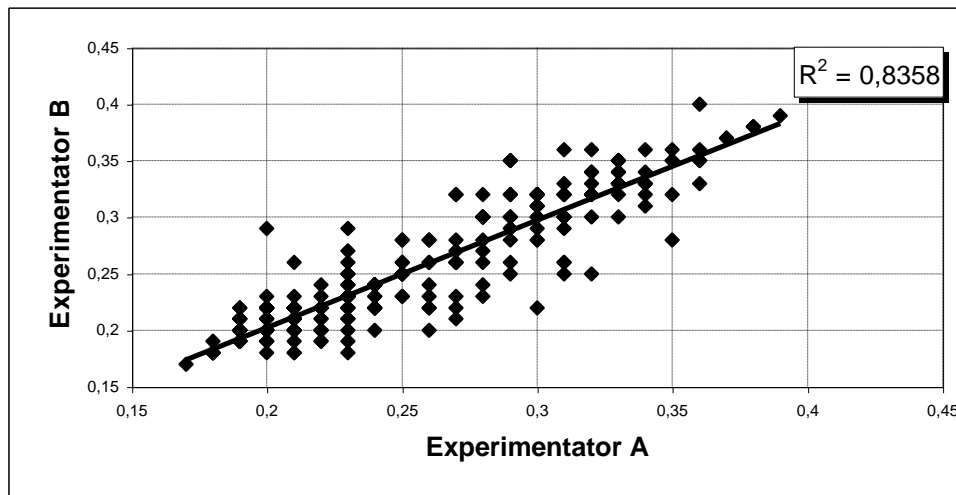


Abb. 2: Unabhängige Ohrdickenbestimmung durch zwei Operanten zeigen die Robustheit der Messmethode

17 *huCD4/DR3*-Mäusen wurde parallel acht Mal das rechte und das linke Ohr von zwei unabhängigen Operanten vermessen. Die Messungen von Experimentator A und B wurde in einem XY Koordinatensystem gegeneinander gestellt. Die zugehörige Regressionsgerade mit Regressionskoeffizient R^2 wurden berechnet.

3.1.2 DTH an sensibilisierten *huCD4/DR3*-Mäusen

Vorexperimente beweisen die Spezifität der DTH-Reaktion. Nur an sensibilisierten Tieren (0,5% DNFB in Vehikel) kann eine Kontaktreaktion am Ohr (0,2% DNFB in Vehikel) ausgelöst werden (**Abb. 3A**). Während der Kontaktreaktion (DNFB/DNFB) steigt die Ohrdicke im Mittel bis zu 48 Stunden stetig an (Durchschnittliche Zunahme $0,22 \pm 0,06\text{mm}$, **Abb. 3**). Danach nimmt die Ohrschwellung wieder ab, nach 96 Stunden beträgt sie $0,14 \pm 0,07\text{mm}$.

Nicht sensibilisierte Tiere zeigen eine geringe Ohrschwellung nach Applikation von DNFB am rechten Ohr (**Abb. 3C**). Diese Schwellung ist gegenüber der Kontaktreaktion (DNFB/DNFB) signifikant niedriger ($p_{12h} = 0,0379$, $p_{24h} = 0,0004$, $p_{48h} = 0,0001$, $p_{72h} = 0,0058$, $p_{96h} = 0,0255$). Sie beträgt im Mittel maximal $0,06 \pm 0,01\text{mm}$ (24 und 48 Stunden) und fällt nach 96 Stunden auf durchschnittlich $0,04 \pm 0,01\text{mm}$ ab (**Abb. 3C**).

Wenn zur Auslösungsphase Vehikel allein appliziert wird (linke Ohren der Versuchstiere), bleibt eine Schwellung nahezu aus, unabhängig davon ob die Tiere sensibilisiert waren oder nicht (DNFB/-, -/-; **Abb. 3B, 3D**). Die Schwellung beträgt im Mittel maximal $0,01 \pm 0,01\text{mm}$ (**Abb. 3**). Der Unterschied zu DNFB-behandelten

Ohren ist an allen Messpunkten signifikant (sensibilisierte Tiere: $p_{12h} = 0,0001$, $p_{24h} = 1,29 \cdot 10^{-8}$, $p_{48h} = 3,9 \cdot 10^{-9}$, $p_{72h} = 2,0 \cdot 10^{-7}$, $p_{96h} = 0,0001$; nicht sensibilisierte Tiere: $p_{12h} = 0,0016$, $p_{24h} = 0,0004$, $p_{48h} = 0,0001$, $p_{72h} = 0,0058$, $p_{96h} = 0,0255$).

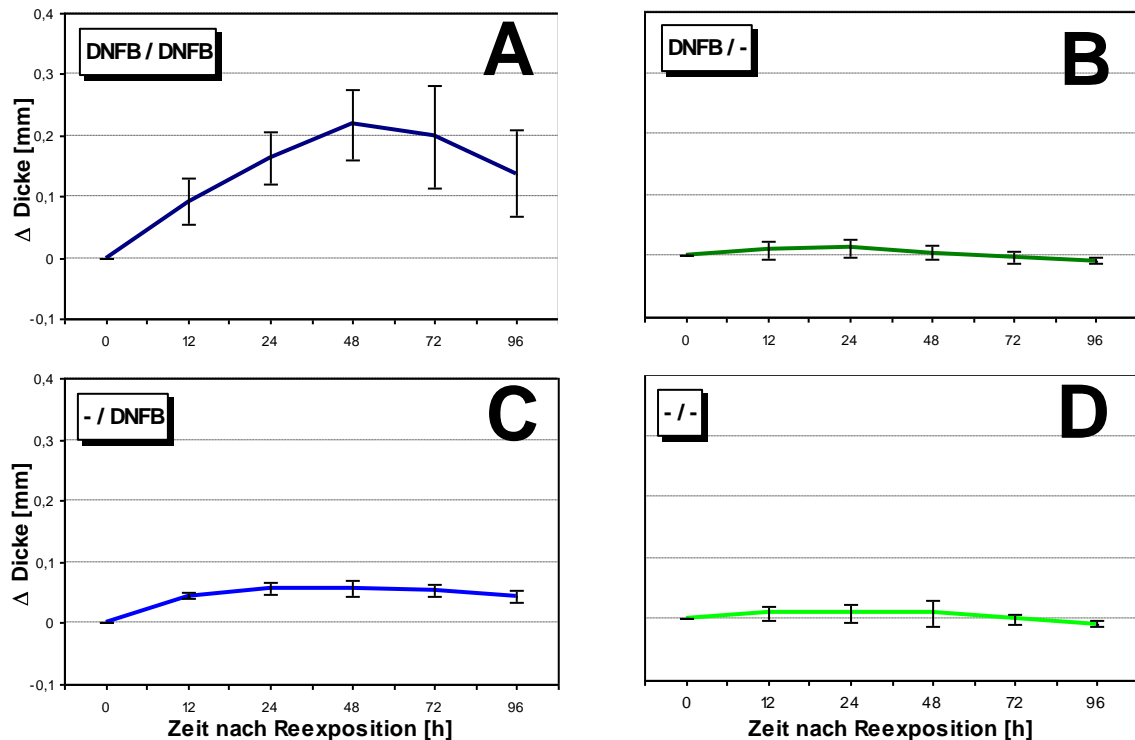


Abb. 3: DNFB induziert eine signifikante Ohrschwellung nur nach Sensibilisierung

Gruppen von vier bis acht *huCD4/DR3*-Mäuse wurden am Bauch mit DNFB (A, B) oder mit der Trägerlösung allein (C, D) behandelt. Nach fünf Tagen wurde am rechten Ohr DNFB (A, C) und am linken Ohr nur Vehikel appliziert (B, D).

Die irritativ-toxische Wirkung des DNFB wird im individuellen Vergleich zwischen rechten und linken Ohr eines Tieres deutlich. Zur Ermittlung der während der Auslösung allein durch das DNFB hervorgerufenen Gewebsschwellung, wurde zuerst von jedem Messwert die Grundohrdrücke (0-h-Wert) abgezogen. Daraufhin ist die so ermittelte Ohrdickenänderung des linken Ohres vom rechten subtrahiert worden. Dieser Wert wurde für jede Maus zu allen Messzeitpunkten bestimmt und gruppenweise gegenüber gestellt (Tab. 4). Des Weiteren wurde mit Hilfe eines 2-seitigen t-Tests für ungepaarte Beobachtungen ermittelt, ob sich die beiden Gruppen signifikant unterscheiden (Tab. 4).

Im Mittel ist die durch DNFB hervorgerufene Ohrschwellung an vorher sensibilisierten Tieren stetig zunehmend bis zu einem Maximum von $0,218 \pm 0,06$ mm, welches

48 Stunden nach Reexposition erreicht wird. Danach verringert sie sich wieder und beträgt nach 96 Stunden im Mittel $0,144 \pm 0,07\text{mm}$.

Im Gegensatz dazu beträgt die durch einmaligen DNFB-Kontakt induzierte Gewebsschwellung nach 48 Stunden $0,048 \pm 0,02\text{mm}$. Die maximale Ohrschwellung wird nach 72 Stunden mit im Durchschnitt $0,055 \pm 0,01\text{mm}$ erreicht. Diese Reaktion ist durch die wiederholte mechanische und chemische Reizung zu erklären.

Maus Nr.	Zeit nach Reexposition (h)						A – sensibilisiert
	0	12	24	48	72	96	
1	0	0,05	0,09	0,17	0,16	0,11	
2	0	0,08	0,15	0,21	0,12	0,06	
3	0	0,11	0,19	0,28	0,31	0,21	
4	0	0,06	0,16	0,22	0,16	0,11	
5	0	0,02	0,09	0,13	0,20	0,14	
6	0	0,09	0,19	0,33	0,39	0,29	
7	0	0,18	0,18	0,23	0,19	0,14	
8	0	0,07	0,13	0,17	0,11	0,09	
							B – nicht sensibilisiert
9	0	0,02	0,03	0,06	0,06	0,03	
10	0	0,02	0,04	0,04	0,04	0,05	
11	0	0,05	0,08	0,07	0,07	0,06	
12	0	0,05	0,04	0,02	0,05	0,06	
t-Test		0,0881	0,0012	0,0005	0,0132	0,0334	

Tab. 4: Ohrdickenänderung nach Korrektur unspezifischer Schwellungseffekte (Reibung durch Auftragen und Messen, Vehikeleffekt).

Sensibilisierte (A) und nicht sensibilisierte Tiere (nur Vehikel am Tag 0, 1; B) wurden am Tag 5 am rechten Ohr mit DNFB und am linken mit Vehikel behandelt. Nach 0, 12, 24, 48, 72 und 96 Stunden wurden die Ohrdicken gemessen. Darstellung der Differenzen zwischen linken und rechten Ohr, und die Ergebnisse des durchgeführten t-Testes nach Student.

Mit Hilfe des t-Tests ist die Wahrscheinlichkeit, mit der sich beide Gruppen unterscheiden, berechnet worden. Die Werte sind in der **Tab. 4** dargestellt, dort wird ersichtlich, dass die Ohrschwellung der beiden Gruppen ab 24 Stunden nach Auslösung sich signifikant unterscheiden ($p \leq 0,05$). Das höchste Signifikanzniveau wird nach 48 Stunden mit $p=0,0005$ erreicht.

Zusammenfassend wird festgestellt, dass (1) DNFB eine signifikant höhere Schwellung in sensibilisierten Tieren bewirkt (Kontaktreaktion) und (2) dass die maximale Ausprägung nach 48 Stunden erreicht wird (**Abb. 4**).

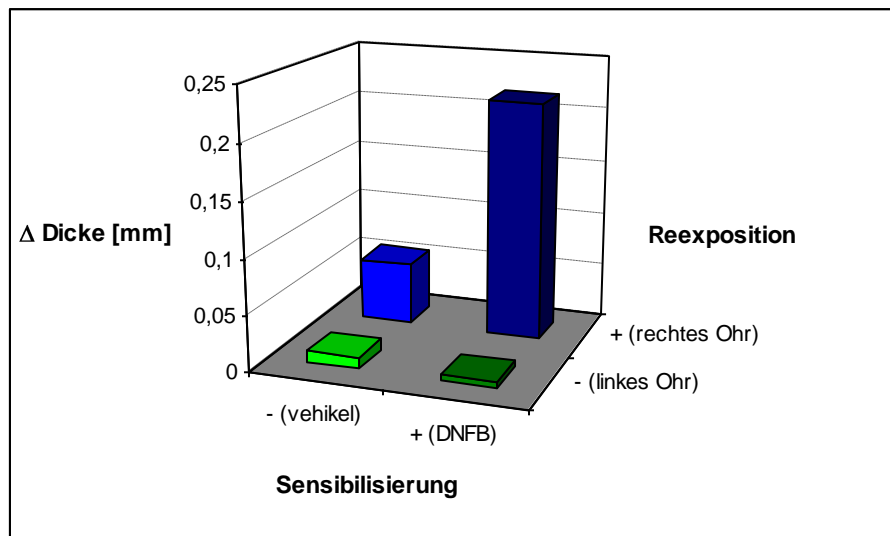


Abb. 4: Das Maximum der Ohrschwellung wird nach 48 h erreicht

In sensibilisierten *huCD4/DR3*-Mäusen (n= 8) beträgt die Schwellung 48 h nach Auslösung am reexponierten rechten Ohr $0,22 \pm 0,06\text{mm}$. Die Exposition von *huCD4/DR3* Kontrolltieren (nicht sensibilisiert, n= 4) führt zu einer Dickenzunahme von $0,048 \pm 0,02\text{mm}$. Die Behandlung mit der Trägerlösung (Vehikel) allein (linke Ohren) führt zu einer Dickenzunahme von $0,01 \pm 0,01\text{mm}$.

3.1.3 Die DTH an sensibilisierten Kontrolltieren

Damit die DTH-Reaktion von *huCD4/DR3*-Mäusen gegenüber DNFB eingeordnet werden kann, wurde auch an Wildtyp-Mäusen eine solche Kontaktallergie mittels DNFB induziert. Dazu wurden Balb/c- und C57/BL6-Mäuse verwendet, welche nach dem Standardprotokoll mit DNFB behandelt wurden.

Die Kinetik der DTH-Reaktion unterscheidet sich zwischen den drei verschiedenen Stämmen. So erreichte die Gewebsschwellung in allen drei Mausgruppen nach 48 Stunden ihr Maximum, deren Ausprägung fiel allerdings unterschiedlich aus.

Die durchschnittliche maximale Änderung der Ohrdicke lag bei den Balb/C-Mäusen bei $0,075 \pm 0,02\text{mm}$ (**Abb. 5**). Im Gegensatz zu den C57/BL6-Tieren und den *huCD4/DR3*-Mäusen, bei denen die Ohrdickenänderung $0,185 \pm 0,007\text{mm}$ bzw. $0,22 \pm 0,06\text{mm}$ betrug (**Abb. 5, Abb. 3**). Die Ohren der Balb/C-Tiere waren bis zum Zeitpunkt 96 Stunden nach Reexposition abgeschwollen, im Mittel betrug die Ohrschwellung des rechten Ohres $0,01 \pm 0,008\text{mm}$. Während zum gleichen Messzeitpunkt die durchschnittliche Ohrdickenänderung der C57/BL6-Mäuse

hingegen $0,085 \pm 0,007\text{mm}$ und in den *huCD4/DR3*-Versuchstieren $0,14 \pm 0,07\text{mm}$ betrug.

Der t-Test nach Student ergab, dass die Ohrschwellung an Balb/C-Mäusen zu allen Messzeitpunkten nach der Reexposition signifikant niedriger ausfällt ($p_{12h} = 0,003$, $p_{24h} = 0,001$, $p_{48h} = 0,0009$, $p_{72h} = 0,006$, $p_{96h} = 0,006$). Anders als bei den C57/BL6-Tieren, dort konnte kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu *huCD4/DR3*-Mäusen festgestellt werden.

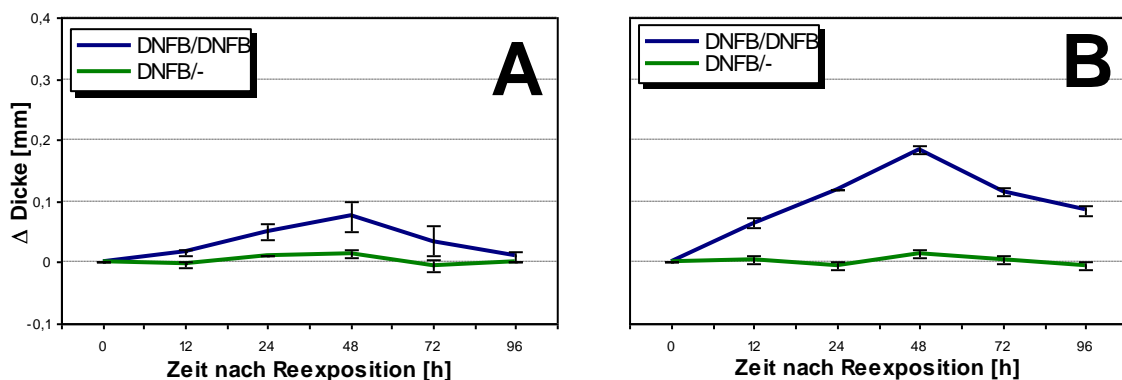


Abb. 5: Das Ausmaß der DTH-Reaktion an C57/BL6 Mäusen ist vergleichbar mit *huCD4/DR3*-Mäusen

Balb/c- (A) und C57/BL6- (B) Mäuse wurden nach dem Standardprotokoll mit DNFB sensibilisiert und am rechten Ohr mit DNFB reexponiert bzw. am linken nur mit der Trägerlösung behandelt (Vergleich Verlauf für *huCD4/DR3*-Mäuse in Abb. 3).

3.1.4 Die mehrfache Auslösung induziert eine gesteigerte DTH

Es sollte geprüft werden, ob

- (1) eine mehrfache Reexposition möglich ist
- (2) die Ohrschwellung verschiedenen Kinetiken folgt.

Dazu wurden sieben sensibilisierte *huCD4/DR3*-Mäuse am Tag 5 (Standardprotokoll) und am Tag 26 ein weiteres Mal mit DNFB behandelt. Innerhalb der 21 Tage zwischen den beiden Kontakten mit 0,2% DNFB-Lösung war die DTH-Reaktion abgeklungen und die Grundohrdrücke der Versuchstiere wieder erreicht.

Die Kinetik der Ohrschwellung und damit der Kontaktallergie nach wiederholter Auslösung war im Vergleich zu der nach einmaliger Reexposition verändert (Abb. 6). Der Anstieg der Gewebsschwellung war steiler, sodass sie schon nach 24 Stunden im Mittel einen Wert von $0,3 \pm 0,08\text{mm}$ erreichte, welcher über dem Maximum der Kontrollgruppe von $0,22 \pm 0,06\text{mm}$ nach 48 Stunden lag. Bis zur nächsten Messung

nahm die Schwellung noch einmal im Mittel um 0,09mm auf $0,39 \pm 0,14$ mm zu. Das Maximum wurde, im Gegensatz zur ersten Reexposition, erst nach 72 Stunden mit einem Wert von $0,41 \pm 0,15$ mm im Mittel erreicht.

Insgesamt war die Ohrschwellung zu den Zeitpunkten 24, 48 und 72 Stunden nach Reexposition im t-Test nach Student signifikant stärker ($p_{24h} = 0,0002$, $p_{48h} = 0,003$, $p_{72h} = 0,002$). 96 h nach Auslösung war der Wert mit $0,15 \pm 0,09$ mm im Mittel vergleichbar mit dem der Kontrollgruppe ($0,14 \pm 0,07$ mm).

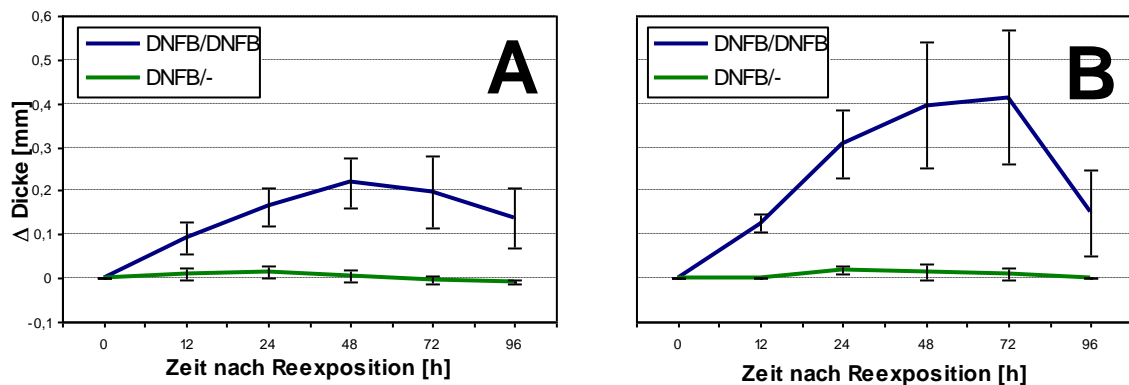


Abb. 6: Eine wiederholte Reexposition mit DNFB induziert eine signifikant stärkere Ohrschwellung

An Zehn *huCD4/DR3*-Mäusen wurde nach dem Standardprotokoll eine DTH-Reaktion mit DNFB induziert (A). Sieben der Tiere wurden am Tag 26 ein weiteres Mal mit DNFB am rechten und nur mit der Trägerlösung am linken Ohr behandelt (B).

3.1.5 Die verzögerte Auslösung führt zur verminderten DTH

Während der Sensibilisierung applizierte mAk könnten mit der Auslösungsphase der DTH interferieren. Deshalb sollte das maximale Zeitintervall ermittelt werden, dass nach Sensibilisierung noch die Auslösung einer deutlichen DTH ermöglicht. Dazu wurden 5 Versuchsgruppen gebildet, in denen die Auslösung am Tag 5 (Standardprotokoll), bzw. an den Tagen 12, 19, 26 oder 33 erfolgte.

Abb. 7 zeigt die durchschnittliche Ohrschwellung über den gesamten Messzeitraum (**Abb. 7 A**) sowie maximale Ohrdickenänderung innerhalb 96 h nach Auslösung (**Abb. 7 B**).

Die durchschnittliche Gewebsschwellung nahm mit der Länge des antigenfreien Intervalls signifikant ab ($p_{d12} = 0,005$, $p_{d19} = 0,0009$, $p_{d26} = 0,003$, $p_{d33} = 0,0005$; t-Test). Gegenüber Standardprotokoll (Auslösung am Tag 5) halbierte sich die

durchschnittliche Ohrdickenänderung nach Auslösung am Tag 33 ($0,078 \pm 0,03\text{mm}$ vs. $0,165 \pm 0,07\text{mm}$ nach Auslösung am Tag 5).

Die maximale Ohrschwellung verringerte sich signifikant ebenfalls mit zunehmendem Intervall ($p_{d12}= 0,18$, $p_{d19}= 0,03$, $p_{d26}= 0,04$, $p_{d33}= 0,02$). Sie betrug bei Reexposition am Tag 33 $0,095 \pm 0,04\text{mm}$ (Standardprotokoll: $0,22 \pm 0,06\text{mm}$).

Die Ohrschwellung der linken Ohren zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen.

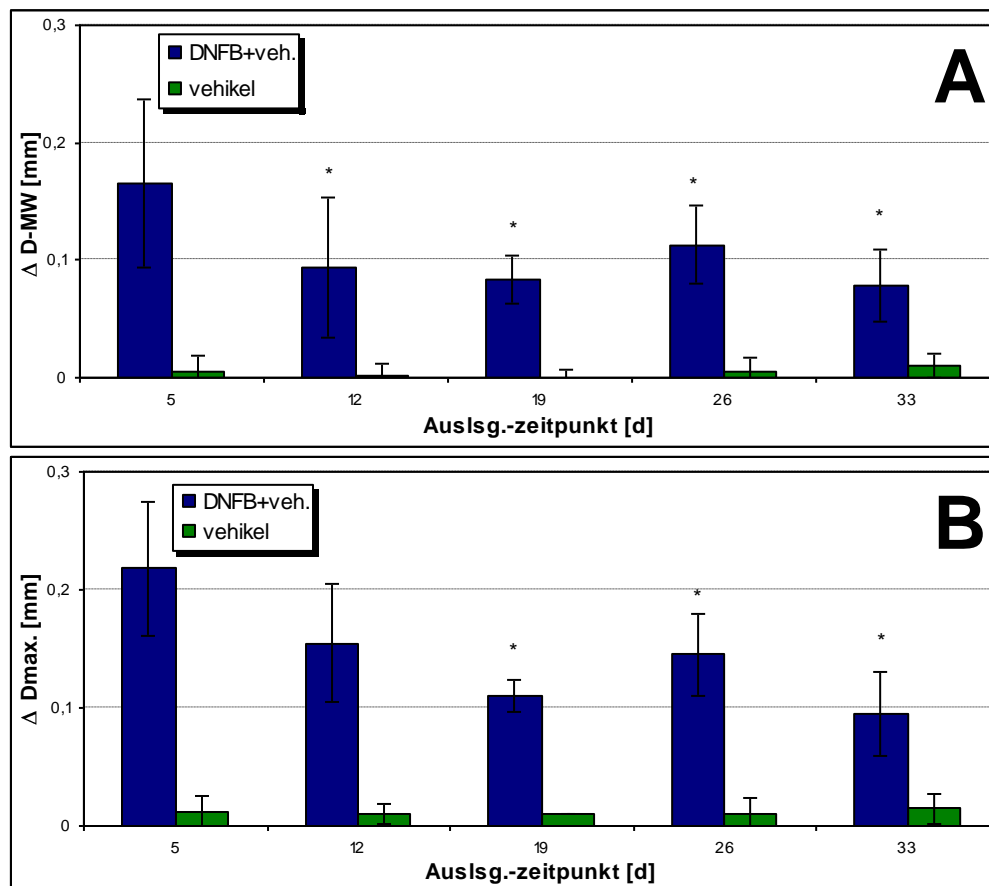


Abb. 7: Die Verlängerung des Intervalls zwischen Sensibilisierung und Auslösung führt zu verringerter Ohrschwellung

An sensibilisierten *huCD4/DR3*-Mäuse ($n=27$) wurden an den Tagen 5 (Standardprotokoll, $n=10$), 12 ($n=2$), 19 ($n=2$), 26 ($n=10$) oder 33 ($n=3$) eine DTH ausgelöst. Die Ohrschwellung (ΔD) wurde 12; 24; 48; 72 und 96 Stunden nach Auslösung gemessen und gemittelt (**A**). Die im Messzeitraum erfassten maximalen Ohrschwellungen sind in (**B**) dargestellt. *Ohrschwellung signifikant verringert gegenüber Standardprotokoll für $p < 0,05$ (t-Test nach Student).

3.2 Unterbrechung der *huCD4* – HLA-DR3 Interaktion führt zu gesteigerter DTH

Während der Inzucht traten Segreganten auf, die nur *huCD4* (DR3-), nur HLA-DR3 (*huCD4*-) bzw. keines der beiden Transgene (DR3-/*huCD4*-) exprimierten. An diesen Tieren wurde eine DTH nach Standardprotokoll induziert. Nicht sensibilisierte Segreganten dienten als Kontrolle.

Alle *huCD4*- Tiere (n=10) zeigten einen deutlich verlängerten Verlauf der Kontaktreaktionen. Die maximale Schwellung wurde 96 h nach Auslösung erreicht. Die Ohrschwellung betrug im Mittel maximal $0,23 \pm 0,08\text{mm}$ (**Abb. 8**). Sie war um durchschnittlich 0,09mm höher als in der *huCD4*/DR3-Kontrollgruppe ($p = 0,02$, zweiseitiger t-Test nach Student). Nach 192 h sinkt die Ohrdickenänderung auf $0,12 \pm 0,06\text{mm}$ im Mittel.

In nicht-sensibilisierten *huCD4*- Tieren (Kontrollgruppe, n=2) führte der DNFB-Kontakt bereits nach 12 h zu einer Reaktion und einem Maximum bei 24 h ($0,13 \pm 0,04\text{mm}$ vs. $0,06 \pm 0,01\text{mm}$ in *huCD4*/DR3-Mäusen). Die Schwellung war signifikant stärker als in *huCD4*/DR3-Mäusen ($p_{12h} = 0,0006$; mit $p_{24h} = 0,007$; t-Test nach Student).

huCD4- Mäuse zeigten nahezu keine Reaktion auf das Vehikel allein (maximal $0,02 \pm 0\text{mm}$).

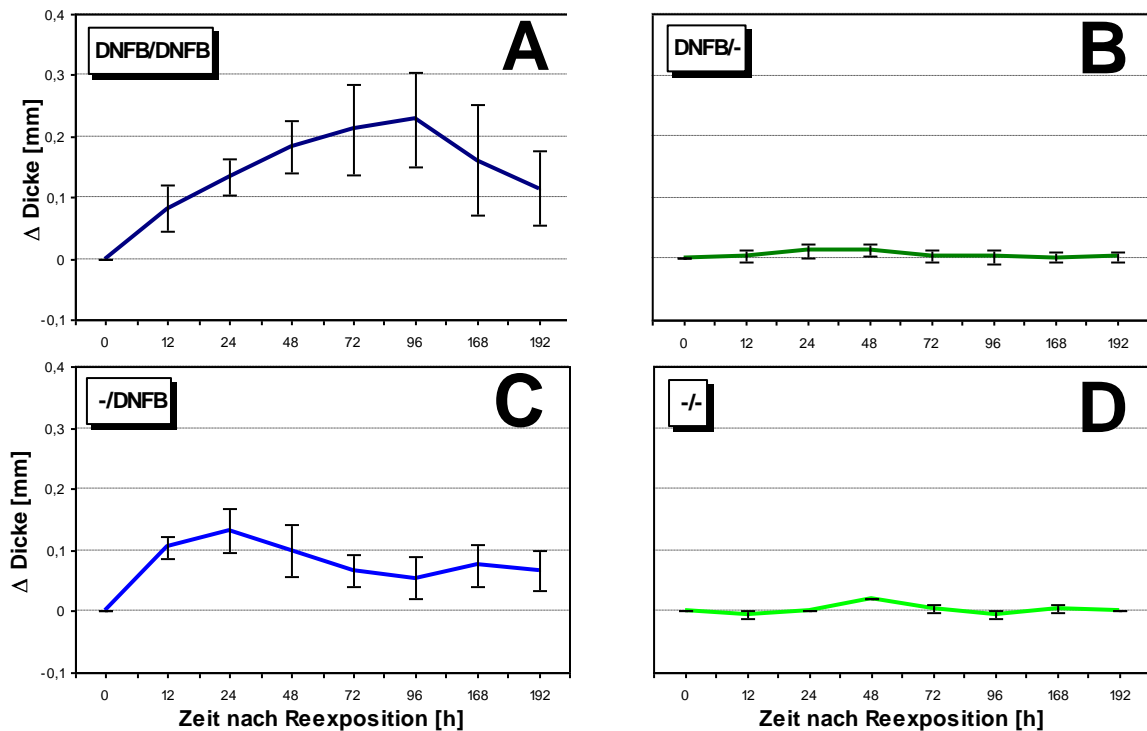


Abb. 8: Ohne CD4 Kostimulation (CD4 KO Mäuse) ist die DTH gesteigert

Gruppen von zwei bis zehn CD4 KO Mäusen wurden nach dem Standardprotokoll mit DNFB sensibilisiert (A, B) oder mit dem Vehikel behandelt (C, D), mit DNFB reexponiert (A, C) bzw. mit Vehikel behandelt (Kontrolle, B, D).

Auch alle DR3- Tiere zeigten eine deutlich länger verlaufende Kontaktreaktion. Die maximale Schwellung trat nach 96 h ein und betrug $0,244 \pm 0,1\text{mm}$ (*huCD4/DR3*-Mäuse: $0,22 \pm 0,06\text{mm}$, 48h; **Abb. 9**). Der Unterschied zu *huCD4/DR3*-Mäusen war signifikant ($p = 0,02$; t-Test).

Nicht sensibilisierte DR3- Tiere entwickelten 12 h nach DNFB-Kontakt eine Ohrschwellung mit einem Maximum bei 24h ($0,123 \pm 0,05\text{mm}$).

DNFB induziert in den DR3- Mäusen eine signifikant höhere Schwellung als in *huCD4/DR3*-Mäusen ($p_{12h} = 0,008$; $p_{24h} = 0,03$; t-Test). Die Behandlung mit dem Vehikel allein (linke Ohren) induziert nahezu keine Reaktion (maximal $0,01 \pm 0\text{mm}$).

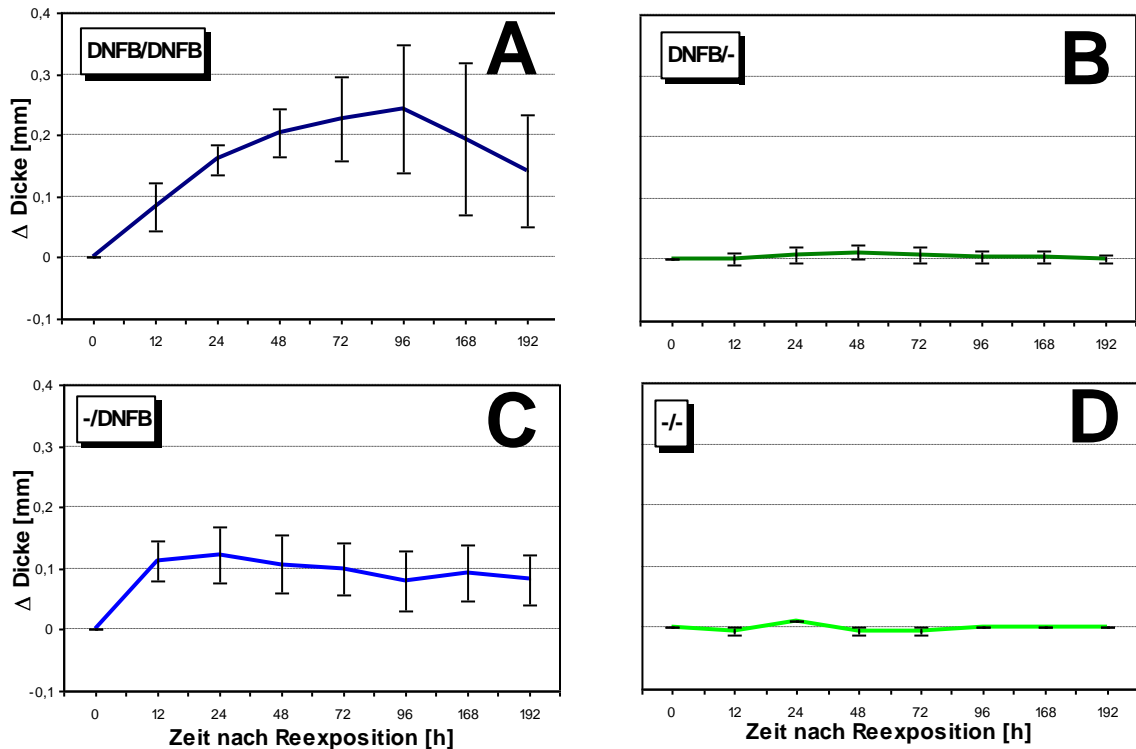


Abb. 9: Ohne MHC II-Moleküle (MHC II KO Mäuse) ist die DTH gesteigert

MHC II KO Mäuse (n=11) wurden nach dem Standardprotokoll mit DNFB sensibilisiert (**A, B**) oder nur mit Vehikel behandelt (n=2; **C, D**). Die Tiere wurden am rechten Ohr mit DNFB (**A, C**) und am linken Ohr mit Vehikel behandelt (**B, D**).

Auch bei Fehlen beider Transgene (*huCD4*-/DR3- Maus) trat im Vergleich zu *huCD4*/DR3 Mäusen eine länger anhaltende und stärkere Kontaktallergie auf. Die Ohrdickenzunahme betrug 0,29mm nach 72h (*huCD4*/DR3 Mäuse: 0,22 \pm 0,06mm nach 48h; **Abb. 10**). Die Gewebsschwellung sank im weiteren Verlauf auf 0,16mm nach 168h.

Auch diese Maus zeigte nahezu keine Reaktion auf die Applikation des Vehikels am linken Ohr (0,03mm nach 48 Stunden).

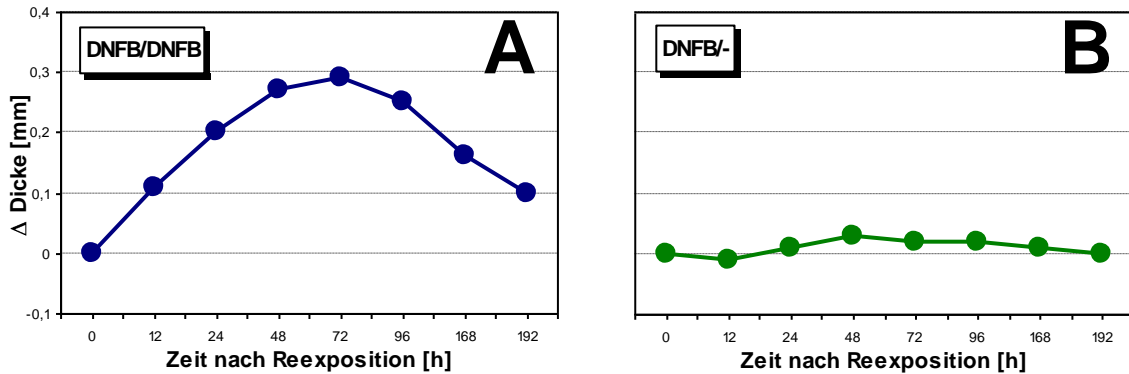


Abb. 10: Ohne MHC II und *huCD4* (*huCD4*-/DR3-/*mucd4*- Maus) ist die DTH gesteigert

Eine Maus mit dem genetischen Status *huCD4*-/DR3-/*mucd4*- wurde nach dem Standardprotokoll mit DNFB behandelt. Das rechte Ohr (A) wurde mit DNFB reexponiert und das linke (B) mit der Trägerlösung allein am Tag fünf behandelt.

3.3 ¹¹¹In-markierte anti-*huCD4*-Fragmente ermöglichen die Lokalisierung und die Quantifizierung von THZ Kompartimenten

3.3.1 Bildgebung mit ¹¹¹In-markierten anti-*huCD4*-Fragmenten

Mit Hilfe ¹¹¹In markierter F(ab)- und F(ab')₂-Fragmente des anti-*huCD4*-mAk MAX16H5 sollte die Akkumulation von T Helfer Lymphozyten während einer DTH nachgewiesen werden. Es wurden Tiere nach zweifach ausgelöster DTH untersucht (stärkere Reaktion, siehe 3.1.4). In sechs *huCD4*/DR3 und zwei CD4 KO Tieren wurde zunächst eine DTH-Reaktion induziert. Nach vollständigem Abklingen der Schwellung wurden in zwei Experimenten jeweils 2 bzw. 3 *huCD4*/DR3-Mäuse und 1 CD4 KO Maus je 15 µCi der markierten F(ab)- oder F(ab')₂-Fragmente intravenös injiziert (Schwanzvene). Nach einer Stunde wurden die rechten Ohren mit 0,2 % DNFB Lösung reexponiert. Als Kontrolle dienten die linken Ohren (nur Vehikel).

24, 48, 72 und 96h nach Reexposition wurden die Ohrdicken der Tiere gemessen und Szintigramme aufgenommen (Versuchsanordnung: **Abb. 11**). Am Ende wurden die Tiere euthanasiert, die Ohren abgetrennt, und die im Gewebe akkumulierte Radioaktivität mittels Szintillationszähler gemessen. Diese wird als Gamma counts per minute (CPM) angegeben. Es wurde sowohl die Differenz der Ohrdicken (re./li.) als auch der CPM (re./li.) berechnet und in Prozent dargestellt (**Abb. 13**).

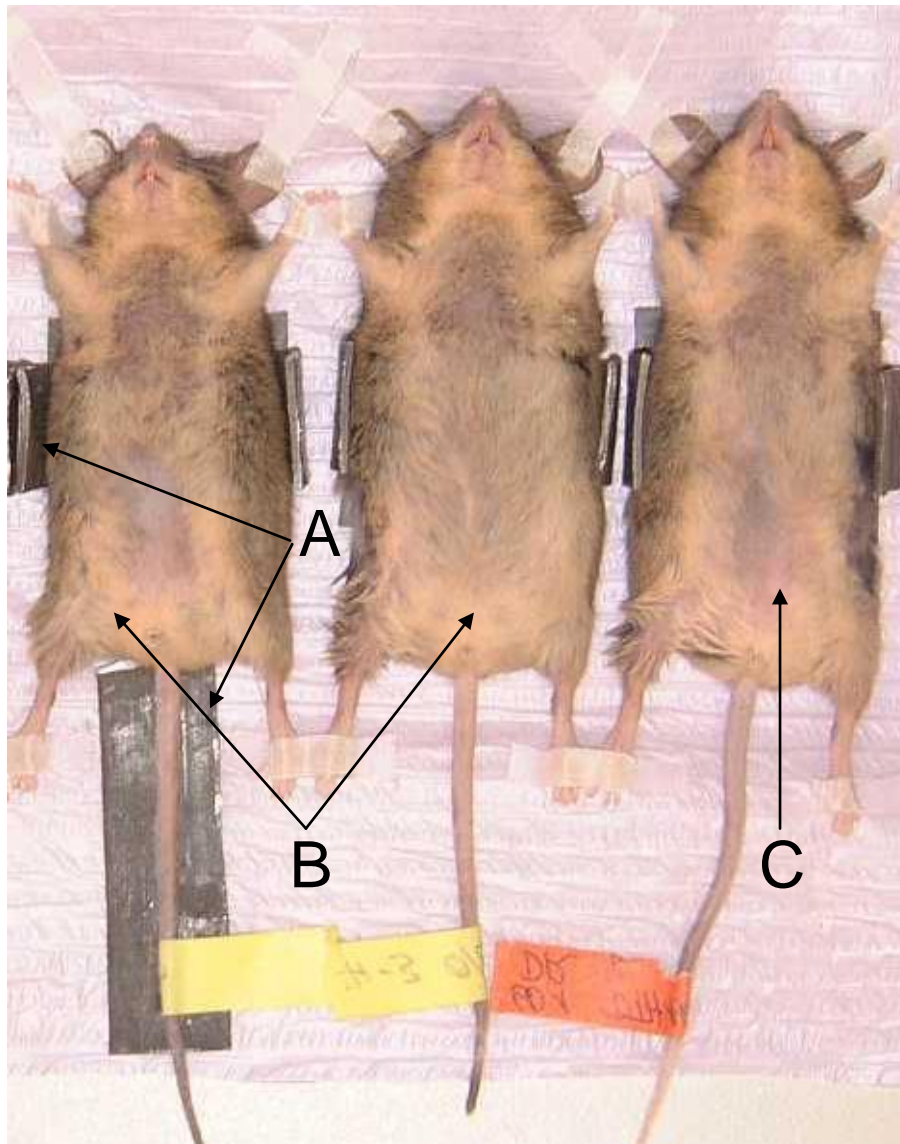


Abb. 11: Versuchsanordnung für Szintigramm der *huCD4/DR3* Mäuse und CD4 KO Maus

Jeweils 2 bzw. 3 *huCD4/DR3*-Mäusen (B) und 1 CD4 KO Maus (C) wurden 15 μ Ci des ^{111}In markierten F(ab)- bzw. F(ab') $_2$ -Fragmenten von MAX16H5 injiziert. Nach 1h wurde an allen Tieren am rechten Ohr sekundär eine DTH-Reaktion gegen DNFB induziert. Dargestellt ist die Lagerungssituation direkt vor Szintigraphie der Tiere. Dargestellt ist auch die notwendige Bleiabschirmung (A) zur Verhinderung von Überstrahlung der Signale durch zur starke Strahlung der Schwanzvene, Nieren bzw. Leber.

Sowohl für ^{111}In -markierte F(ab)- als auch für F(ab') $_2$ -Fragmente war eine Akkumulation in den rechten Ohren nachweisbar (Abb. 12).

Nach Injektion von ^{111}In -markierten F(ab)-Fragmenten konnte anhaltend eine Anreicherung in den rechten Ohren der *huCD4/DR3*-Mäuse während des Untersuchungszeitraums nachgewiesen werden. Zwischen dem rechten und dem linken Ohr der behandelten CD4 KO Maus konnte kein wesentlicher Unterschied beobachtet werden (Abb. 12).

Auch die mit ^{111}In markiertem F(ab')_2 -Fragment behandelten Tiere zeigten eine über den Untersuchungszeitraum anhaltende Akkumulation in den rechten Ohren. Dies betraf jedoch sowohl die *huCD4/DR3*-Mäuse als auch die CD4 KO Maus (**Abb. 12**).

Sowohl nach Injektion von F(ab')_2 - als auch nach Injektion von F(ab')_2 -Fragmenten konnte in *huCD4/DR3*-Tieren eine deutlich Anreicherung im Bereich des Humerus und des Femurs nachgewiesen werden, welche sich in den CD4 KO Tieren nicht zeigte.

Zusätzlich kann nach Injektion ^{111}In markierter F(ab')_2 -Fragmente in allen behandelten Tieren eine deutliche Aktivitätsanreicherung im Bereich der Nieren beobachtet werden (**Abb. 12**).

Nach Injektion von F(ab')_2 -Fragmente ist eine deutliche Aktivitätsanreicherung im Bereich der Leber zu beobachten. Darüber hinaus ist eine deutliche Aktivitätsanreicherung im Bereich der Injektionsstelle an vielen Tieren zu beobachten. Diese massive intraabdominelle Anreicherung bzw. Anreicherung im Bereich der Injektionsstelle machten eine Bleiabschirmung an diesen Stellen notwendig (**Abb. 11**).

Diese Daten konnten in einem weiteren Experiment so bestätigt werden.

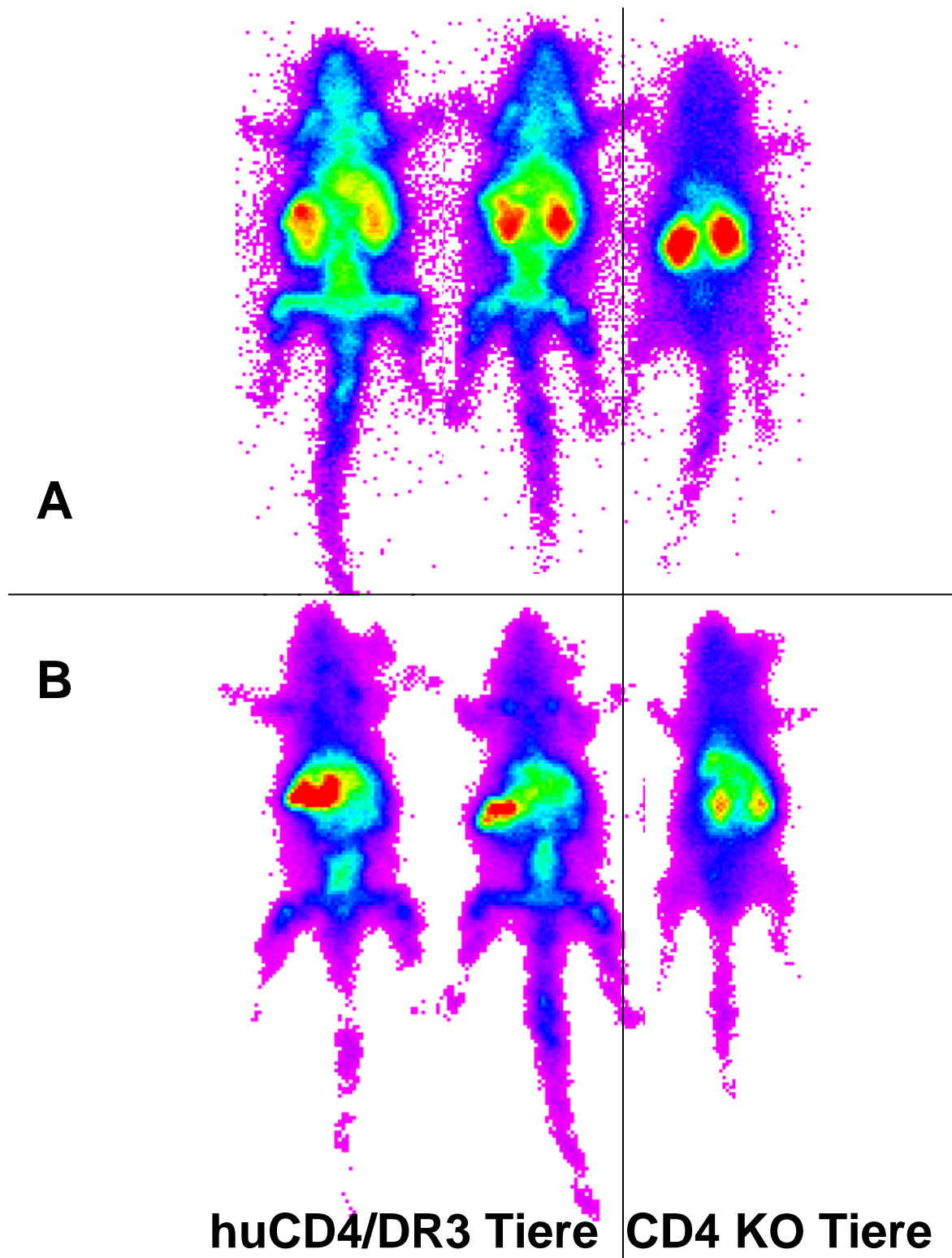


Abb. 12: Mittels ^{111}In markierter F(ab)-Fragmente von MAX16H5 lässt sich spezifisch eine chronische Entzündungsreaktion darstellen

Jeweils 2 bzw. 3 *huCD4/DR3*-Mäusen und 1 *CD4 KO* Maus wurden 15 μCi von ^{111}In markierte F(ab)- (A) bzw. F(ab')₂- (B) Fragmenten von MAX16H5 injiziert. Nach 1h wurde an allen Tieren am rechten Ohr sekundär eine DTH-Reaktion gegen DNFB induziert. Dargestellt sind die szintigraphischen Aufnahmen zum Zeitpunkt der maximale Ohrschwellung 48h nach Injektion bzw. Auslösung.

3.3.2 Quantifizierung der THZ Anreicherung in der DTH mittels Gamma Counter

Nach Injektion von F(ab)-Fragmenten konnte für die *huCD4/DR3*-Tiere eine Mehranreicherung in den rechten Ohren von 79,37%, 70,1% bzw. 78,45% nachgewiesen werden. Bei Behandlung der CD4 KO Maus zeigte sich eine im Seitenvergleich verminderte Anreicherung von -2,74% in dem rechten Ohr (**Abb. 13**). Die Aktivitätssignale im Gamma Counter der mit F(ab)₂ behandelten Tiere waren insgesamt wesentlich stärker. Es zeigte sich eine Mehranreicherung im rechten Ohr der CD4 KO Maus von 75,67% und in den *huCD4/DR3*-Tieren von 91,63%, 77,94% und 85,67% (**Abb. 13**).

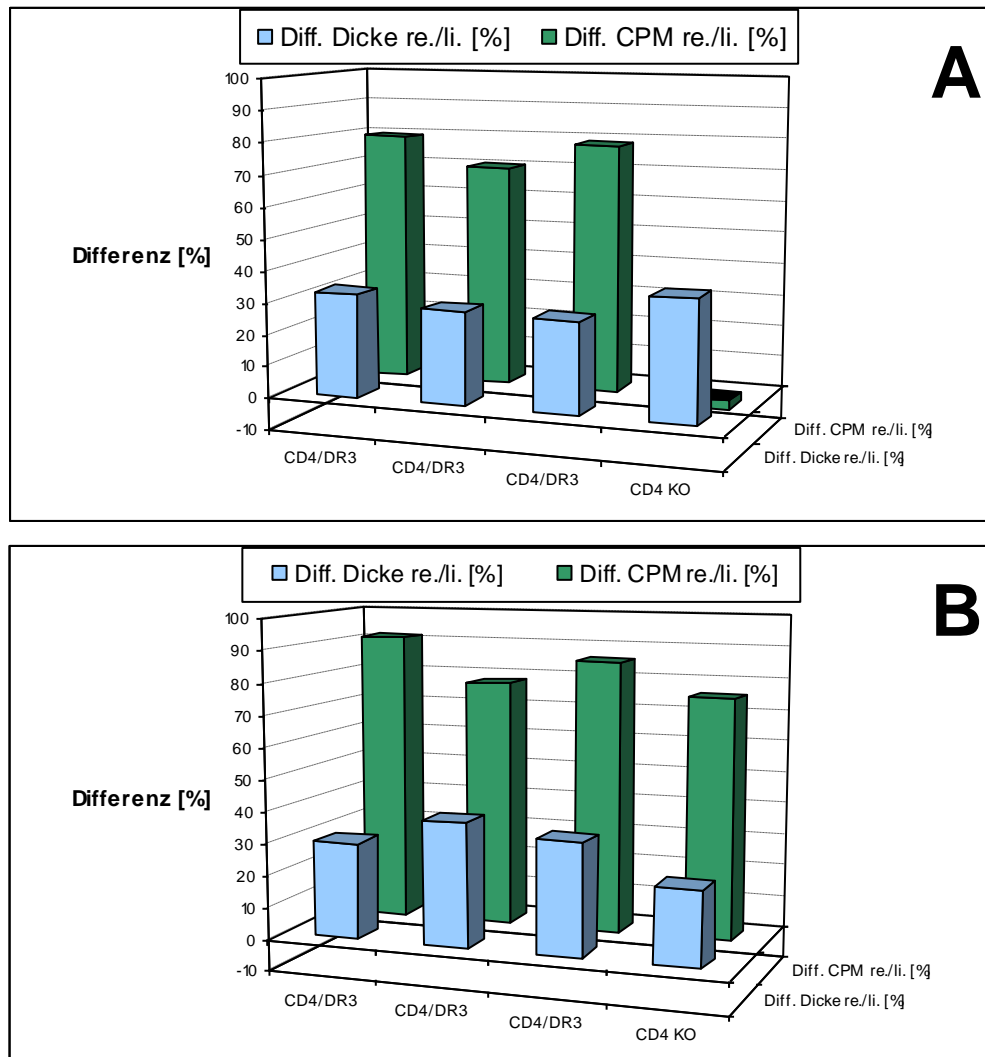


Abb. 13: Mittels ^{111}In markiertem F(ab)-Fragment lässt sich spezifisch eine Entzündungsreaktion detektieren

Jeweils 3 *hu*CD4/DR3-Tiere und 1 CD4 KO Maus wurden mit 15 μCi des ^{111}In markierten F(ab)- (A) oder F(ab')₂- (B) Fragment behandelt. Daraufhin wurde an den Tieren am rechten Ohr wiederholt eine DTH-Reaktion gegen DNFB ausgelöst. Dargestellt sind die Differenz der Dicke und der Gamma counts per minute (CPM) nach 96 h zwischen den rechten und linken Ohren in % für jedes einzelne Tiere.

3.4 Die Sensibilisierung mit DNFB wird durch anti-*hu*CD4 beeinflusst

3.4.1 Sensibilisierung unter anti-*hu*CD4 vermindert die DTH

Es sollte untersucht werden, ob die DTH-Reaktion durch eine anti-*hu*CD4-Behandlung mit MAX16H5 oder MAX12F6 während der Sensibilisierungsphase beeinflusst werden kann.

Voruntersuchungen zeigten, dass anti-*hu*CD4-mAk T-Helfer Lymphozyten depletiert (**Abb. 15**). Da der Antikörpereinfluss auf die Sensibilisierungsphase (nicht auf die Auslösungsphase) untersucht werden sollte, wurde die Auslösung auf Tag 26 gelegt (vergl. **Abb. 7**).

Jeweils 6 *hu*CD4/DR3-Mäuse wurden mit 15 µg/g Körpergewicht MAX16H5 oder MAX12F6 am Tag -2, -1 und 0 i. p. injiziert. Die letzte Injektion fand 30 Minuten vor dem ersten DNFB Kontakt statt. Für eine flowzytometrische Untersuchung des Einflusses von MAX16H5 und MAX12F6 auf die PBMZ wurde den Mäusen an den Tagen -10, 1 und 26 Peripherblut aus dem Retroorbitalplexus entnommen.

Als Kontrollen dienten 4 unbehandelte (w/o), 2 MOPC21-behandelte bzw. 3 UPC10-behandelte Versuchstiere (Isotypkontrollen für MAX16H5 bzw. MAX12F6). Die DTH-Reaktion in Mäusen ohne Ak-Behandlung führte 48h nach Auslösung zu einer maximalen Ohrschwellung von $0,145 \pm 0,03\text{mm}$ und war mit den Voruntersuchungen vergleichbar (**Abb. 14E**, vergl. **Abb. 7**). In Isotyp-behandelten Mäusen wurde eine verlängerte DTH-Reaktion festgestellt. In allen beiden Gruppen wurde eine maximale Ohrschwellung nach 48 Stunden erreicht (MOPC21: $0,135 \pm 0,007\text{mm}$, UPC10: $0,12 \pm 0,03\text{mm}$, w/o: $0,145 \pm 0,03\text{mm}$). Für MOPC21 war die Schwellung nach 168h und 192h im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (w/o) signifikant erhöht ($p_{168\text{h}} = 0,03$, $p_{192\text{h}} = 0,005$).

Die MAX16H5-Behandlung reduzierte die DTH-Reaktion signifikant im Vergleich zu MOPC21 ($p_{48\text{h}} = 0,012$, $p_{96\text{h}} = 0,039$, $p_{168\text{h}} = 0,014$, $p_{192\text{h}} = 0,006$) und zur Kontrollgruppe (w/o: $p_{24\text{h}} = 0,013$, $p_{48\text{h}} = 0,008$). Im Unterschied zu den Kontrollen (48h) wurde eine maximale Ohrdickenänderung bei MAX16H5 Behandlung erst 72h nach Auslösung erreicht ($0,1 \pm 0,023\text{mm}$).

Die MAX12F6-Behandlung hatte eine weniger deutliche Reduktion der DTH-Reaktion zur Folge. Nur zu den Messzeitpunkten 24 und 48 h nach Auslösung zeigte sich im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollgruppe eine signifikant reduzierte Gewebsschwellung ($p_{24\text{h}} = 0,04$, $p_{48\text{h}} = 0,03$). Die Tiere zeigten 72h nach Auslösung eine maximale Ohrdickenänderung ($0,103 \pm 0,02\text{mm}$).

Zwischen den mit MAX16H5 und den mit MAX12F6 behandelten *hu*CD4/DR3-Mäusen konnte zu keinem Messzeitpunkt ein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

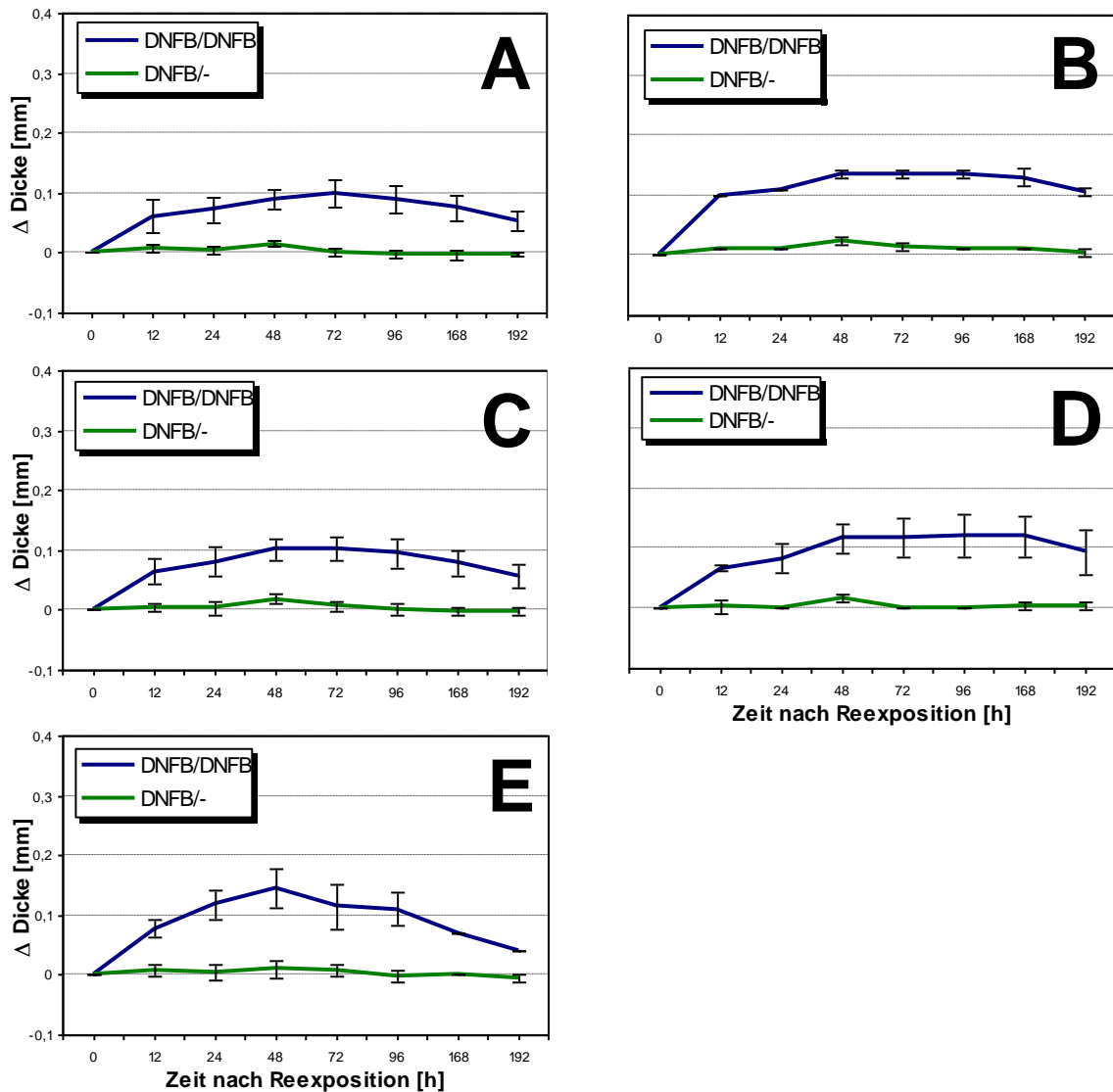


Abb. 14: Eine anti-*hu*CD4-Behandlung während der Sensibilisierungsphase führt zu einer verringerten DTH

*Hu*CD4/DR3-Mäuse wurden nach dem Standardprotokoll mit DNFB sensibilisiert und jeweils am rechten Ohr mit DNFB reexponiert und am linken Ohr nur mit Vehikel behandelt. An den Tagen -2, -1 und null (eine Stunde vor Sensibilisierung) erhielten die Tiere eine i.p. Injektion mit anti-*hu*CD4 (A- MAX16H5, C- MAX12F6) bzw. mit Isotypkontrollen (B- MOP-C21, D- UPC-10). Eine Gruppe wurde keiner Antikörperbehandlung unterzogen (E).

3.4.2 anti-*hu*CD4 depletiert periphere THZ und vermindert deren CD4-Expression

Mit Hilfe flowzytometrischer Analysen (FACS) wurden Veränderungen im peripheren T-Zell-Kompartiment nach Applikation von anti-*hu*CD4-mAk während der Sensibilisierungsphase erfasst.

Dazu wurden je 6 *huCD4/DR3*-Mäuse an den Tagen -2, -1 und 0 mit je 15 µg/g Körpergewicht MAX16H5 oder MAX12F6 injiziert (Tag 0 - Sensibilisierung). Kontrolltiere wurden die Isotypkontrollen MOPC21 bzw. UPC10 injiziert. Die FACS-Analysen erfolgten an den Tagen -10, 1 und 26 an Peripherblut aus dem Retroorbitalplexus. Die FACS-Analysen wurden auf die Ausgangswerte (100%; Tag -10) bezogen (**Abb. 15**).

Sowohl MAX16H5 als auch MAX12F6 führten zu einer signifikanten Reduktion der zellulären *huCD4*-Expression am Tag 1 (MAX16H5: $44 \pm 12\%$, $p_{d1} = 0,0005$, MAX12F6 $16 \pm 5\%$, $p_{d1} = 2,16 \cdot 10^{-7}$). Die Expressionslevel stiegen danach bis zum Tag 26, wobei die Ausgangswerte nicht erreicht wurden (MAX16H5: $66 \pm 10\%$, $p_{d26} = 2,9 \cdot 10^{-5}$, MAX12F6 $39 \pm 10\%$, $p_{d26} = 7,92 \cdot 10^{-9}$). MAX12F6 führte zu einer stärkeren Reduktion an beiden Messzeitpunkten ($p_{d1} = 0,0005$, $p_{d26} = 2,31 \cdot 10^{-5}$).

Beide monoklonalen Antikörper führten zum Verlust von THZ in Zirkulation. Am Tag 1 waren nach MAX16H5 noch $45 \pm 13\%$ der THZ nachweisbar (signifikant gegenüber Tag-10; $p_{d1} = 0,0006$). MAX12F6 reduzierte die Anzahl zirkulierender THZ auf $15 \pm 6\%$ gegenüber Tag -10 ($p_{d1} = 5,13 \times 10^{-7}$). Bis zum Tag 26 stieg der THZ Anteil wieder an und erreichte in der MAX16H5-Gruppe $66 \pm 14\%$ gegenüber Ausgangswert ($p_{d26} = 7,90 \times 10^{-5}$) und in der MAX12F6-Gruppe $37 \pm 12\%$ ($p_{d26} = 3,63 \times 10^{-8}$). Die Unterschiede in der Reduktion der THZ zwischen den beiden Gruppen waren zu beiden Analysezeitpunkten signifikant ($p_{d1} = 0,0008$, $p_{d26} = 0,0001$).

In den Isotypkontrollen waren am Tag 1 sowohl CD4-Expressionslevel (UPC10: $123 \pm 14\%$; MOPC21: $158 \pm 1\%$, $p_{d1} = 0,008$) als auch der Anteil zirkulierender THZ (UPC10: $117 \pm 14\%$, MOPC21: $156 \pm 23\%$) erhöht.

Am Tag 26 wurden in der UPC10-Gruppe die Ausgangswerte nahezu erreicht (*huCD4*-Expression $93 \pm 8\%$, THZ Anteil $98 \pm 13\%$). In der MOPC21-Gruppe betrug die *huCD4*-Expression $74 \pm 6\%$ ($p_{d26} = 0,04$), und der Anteil TH-Zellen $77 \pm 3\%$ ($p_{d26} = 0,04$) gegenüber den Ausgangswerten. Die Unterschiede zwischen beiden Gruppen hinsichtlich der *huCD4*-Expression waren zu beiden Zeitpunkten signifikant ($p_{d1} = 0,05$, $p_{d26} = 0,004$). Für die zirkulierenden THZ war die Differenz nur am Tag 26 signifikant ($p_{d1} = 0,09$, $p_{d26} = 0,009$).

Die CD8⁺ T-Zellen nahmen nach MAX16H5 und MAX12F6 Applikation bis zum Tag 1 signifikant zu (MAX16H5: $133 \pm 19\%$, $p_{d1} = 0,008$, MAX12F6: $139 \pm 30\%$, $p_{d1} = 0,03$). In beiden Gruppen betrug am Tag 26 der Anteil der CD8⁺ T-Zellen $121 \pm 17\%$, $p_{d26} = 0,08$ (MAX16H5) bzw. $124 \pm 20\%$, $p_{d26} = 0,007$ (MAX12F6).

Nach MOPC21 betrug der Anteil zirkulierender CD8⁺ T-Zellen 98% (Tag1) bzw. 117% (Tag 26; $p_{d26} = 0,02$). Unter UPC10 Behandlung wurden 113% (Tag 1) bzw. 119% (Tag 26; $p_{d26} = 0,02$) erfasst.

Der Anteil zirkulierender NK-Zellen nahm nach MAX16H5 und MAX12F6 Behandlung am Tag 1 signifikant zu (MAX16H5: $158 \pm 26\%$, $p_{d1} = 0,02$, MAX12F6: $156 \pm 9\%$, $p_{d1} = 0,0002$). Am Tag 26 wurden für MAX16H5 $103 \pm 19\%$ und für MAX12F6: $111 \pm 34\%$ ermittelt (nicht signifikant, $p_{d26} = 0,66$ bzw. $0,34$).

Unter MOP-C21 stiegen die Werte auf 163% ($p_{d1} = 0,05$) und verringern sich danach wieder auf 65% am Tag 26 ($p_{d26} = 0,003$). Die UPC-10 Behandlung führte nicht zu signifikanten Unterschieden (109% am Tag 1; 93% am Tag 26).

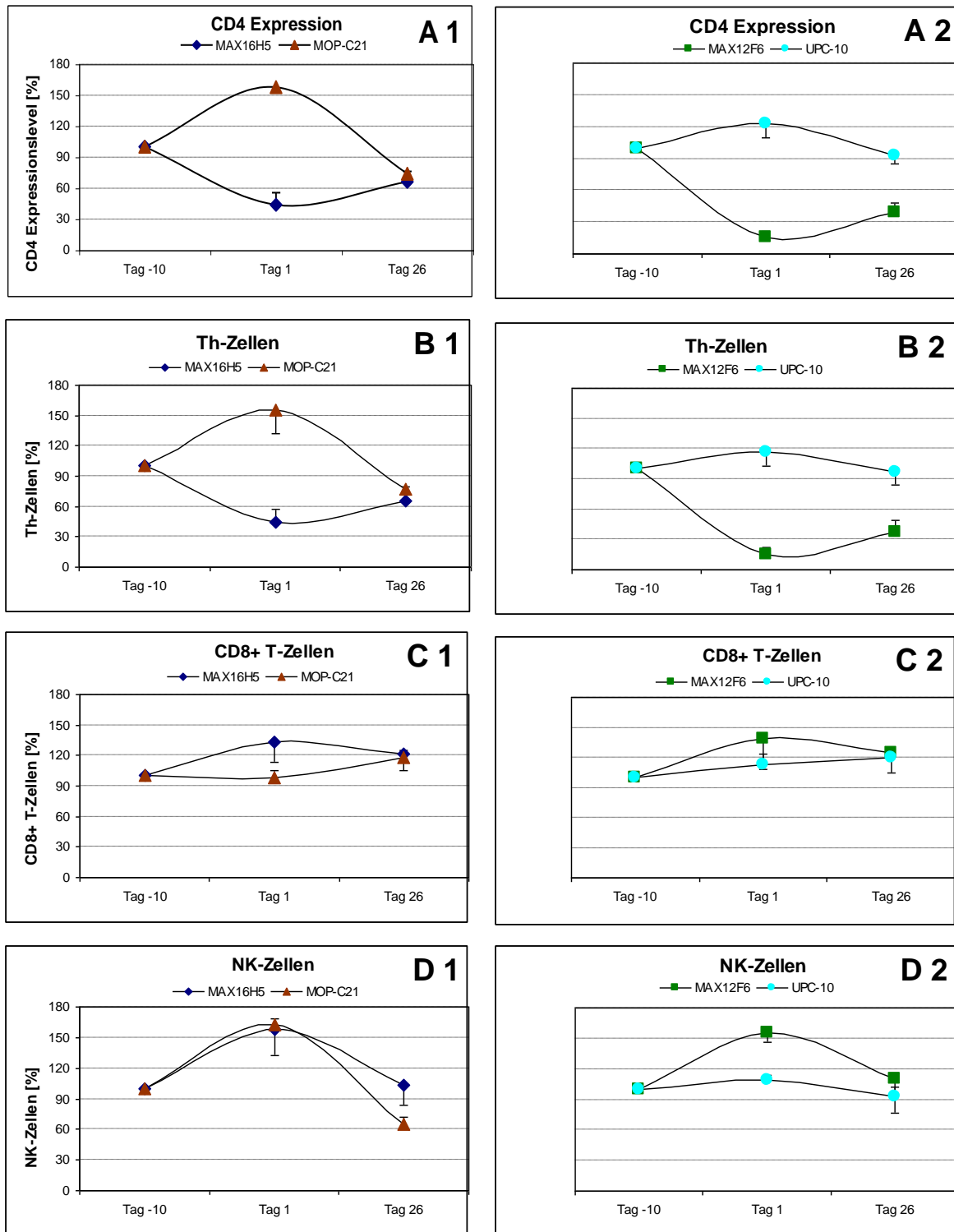


Abb. 15: Eine MAX16H5 und MAX12F6 Behandlung während der Sensibilisierungsphase führt zur Depletion von TH-Zellen

Den mit den verschiedenen Antikörpern behandelten Mäusen wurde an den Tagen -10, 1 und 26 Peripherblut entnommen und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Untersucht wurden Th-, CD8+, NK- Zellen und die CD4 Expression auf den Th- Zellen. Dargestellt sind die Werte in Prozent des Ausgangswertes.

Weitere Analysen sollten klären, ob der erfasste THZ-Verlust bestimmte Subpopulationen vorrangig betrifft. Dazu wurden CD62L (Marker für naive THZ) und CD25 (Marker für aktivierte THZ bzw. regulatorischen T-Zellen) analysiert und mit den Ausgangswerten (Tag-10; 100%) verglichen (**Abb. 16**).

Sowohl MAX16H5 als auch MAX12F6 führten am Tag 1 zu einer signifikanten Reduktion der CD25 positiven TH-Zellen (MAX16H5: $89 \pm 4\%$, $p_{d1} = 0,005$, MAX12F6 $70 \pm 8\%$, $p_{d1} = 0,0002$). Bis zum Tag 26 stieg ihr Anteil an. Bei MAX12F6 Behandlung war ein signifikanter Unterschied zum Ausgangswert feststellbar (MAX16H5: $96 \pm 6\%$, $p_{d26} = 0,07$, MAX12F6 $95 \pm 3\%$, $p_{d26} = 0,0003$). Nur am Tag 1 bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($p_{d1} = 0,0009$, $p_{d26} = 0,66$).

Naive (CD62L positive TH-Zellen) waren nach anti-*hu*CD4-Behandlung am Tag 1 signifikant verringert (MAX16H5: $63 \pm 8\%$, $p_{d1} = 0,0001$, MAX12F6 $62 \pm 10\%$, $p_{d1} = 0,0003$). Bis zum Tag 26 erreichte diese Zellpopulation in beiden Gruppen den Ausgangswert (MAX16H5: $100 \pm 4\%$, $p_{d26} = 0,87$, MAX12F6 $97 \pm 5\%$, $p_{d26} = 0,14$).

Die Isotypkontrollantikörper MOP-C21 und UPC-10 beeinflussten naive (CD62L positive) TH-Zellen zu beiden Analysezeitpunkten kaum (MOPC21: d1 $107 \pm 2\%$, d26 $95 \pm 6\%$, UPC10: d1 $111 \pm 4\%$, d26 $93 \pm 4\%$). CD25 positive TH-Zellen wurden durch MOPC21 und UPC10 nur wenig verändert (MOPC21: d1 $105 \pm 0,5\%$, d26 $99 \pm 2\%$, UPC10: d1 $99 \pm 4\%$, d26 $101 \pm 2\%$).

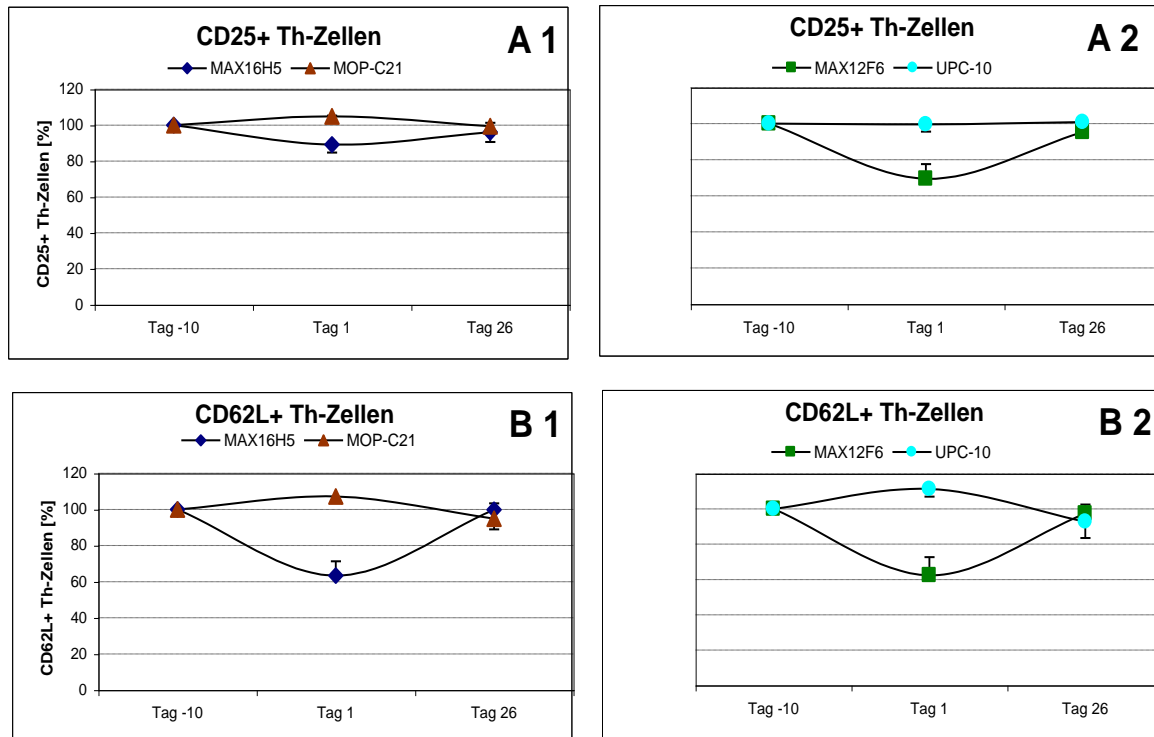


Abb. 16: Reduktion von CD62L positiven/CD25 positiven TH-Zellen durch eine MAX16H5 und MAX12F6 Behandlung während der Sensibilisierungsphase

Den mit Antikörper behandelten Mäusen wurde an den Tagen -10, eins und 26 Peripherblut entnommen, und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Innerhalb dieser Analysen wurde auch der Aktivitätszustand der CD4+ T-Zellen mittels der Oberflächenmarker CD25 und CD62L bestimmt.

3.5 Die Auslösung der DTH wird durch anti-*hu*CD4 beeinflusst

3.5.1 MAX16H5 und MAX12F6 wirken gegensätzlich auf die DTH

Der Einfluss einer anti-*hu*CD4-Behandlung mit MAX16H5 oder MAX12F6 auf die Auslösungsphase wurde untersucht. Dazu wurde jeweils 7 *hu*CD4/DR3-Mäusen MAX16H5 oder MAX12F6 an den Tagen Tag 5, 6 und 7 i. p. injiziert. Jeweils 2 Mäuse wurden mit den zugehörigen Isotyp-Kontrollantikörpern behandelt. Den Tieren wurden an den Tagen -10, 8 und 26 Peripherblut aus dem Retroorbitalplexus entnommen.

In der mit MAX16H5 behandelten Gruppe wurde im Vergleich zu den Kontrollgruppen eine reduzierte und verkürzte DTH-Reaktion (**Abb. 17A**) festgestellt. MAX12F6 führte zur stärkeren und länger andauernden Gewebsschwellung (**Abb.17C**).

In den Isotypkontrollen wurden nach 48 h eine maximale Ohrschwellung zwischen $0,22 \pm 0,05\text{mm}$ (MOPC21 Behandlung) und $0,26 \pm 0\text{mm}$ (UPC10 Behandlung) festgestellt. 96h nach Auslösung betrug die Schwellung $0,11 \pm 0,09\text{mm}$ bzw. $0,15 \pm 0,02\text{mm}$.

Unter MAX16H5 Behandlung wurde eine maximale Ohrdickenänderung nach 48h erreicht. Diese betrug im Mittel $0,096 \pm 0,03\text{ mm}$. In der Isotypkontrollgruppe wurden zum Messzeitpunkt 48h $0,22 \pm 0,05\text{mm}$) Dieser Unterschied war signifikant für $p_{48h} = 0,014$.

In der mit MAX12F6 behandelten Gruppe war eine länger anhaltende und ausgeprägtere DTH-Reaktion zu beobachten. Die Ohrschwellung erreichte einen Wert von im Mittel $\geq 0,2\text{mm}$ im Zeitraum 48h bis 168h nach Auslösung. Die maximale Gewebsschwellung trat nach 72h ein und betrug $0,23 \pm 0,1\text{mm}$. Im Vergleich zu der mit UPC10 behandelten Gruppe wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt.

Im Vergleich zwischen der MAX16H5 und der MAX12F6 Behandlungsgruppe wurden zu allen Messzeitpunkten deutlich signifikante Unterschiede erfasst ($p_{12h} = 0,0002$, $p_{24h} = 3,0 \cdot 10^{-5}$, $p_{48h} = 0,007$, $p_{72h} = 0,044$, $p_{96h} = 0,036$, $p_{168h} = 0,013$, $p_{192h} = 0,008$).

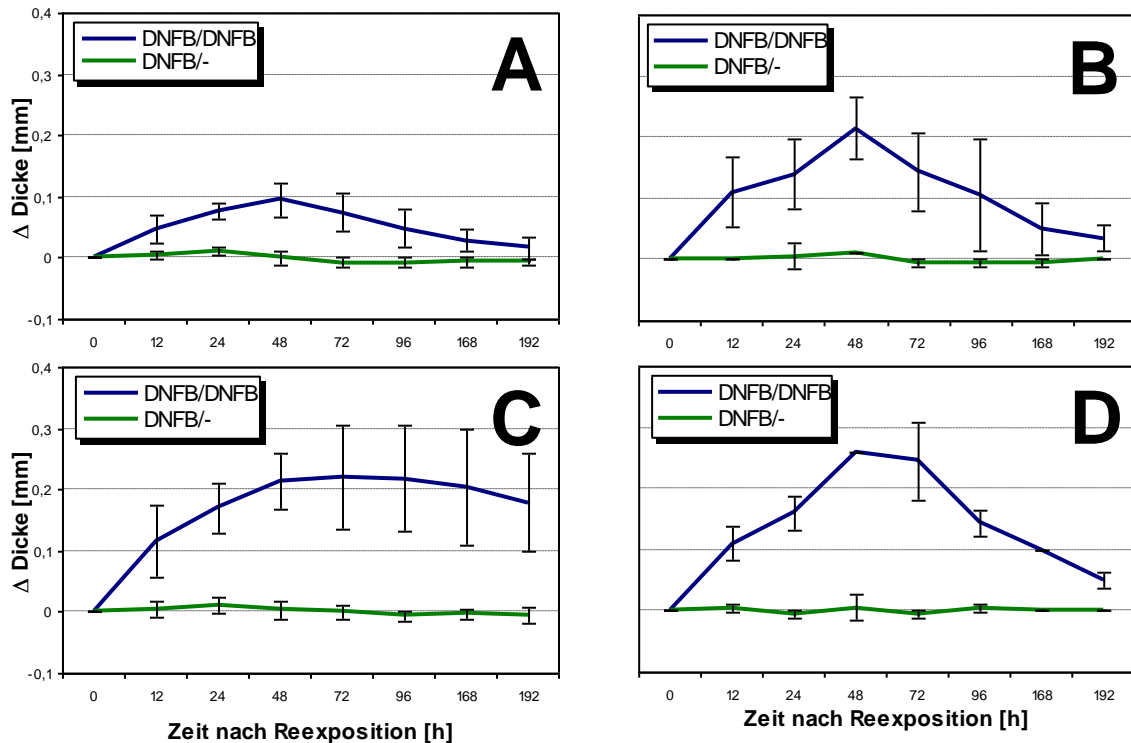


Abb. 17: Eine MAX16H5 Behandlung während der Auslösungsphase verringert signifikant die DTH gegen DNFB

2 bzw. 7 *huCD4/DR3*-Mäuse wurden nach dem Standardprotokoll mit DNFB sensibilisiert, und jeweils am rechten Ohr mit DNFB reexponiert und am linken nur mit der Trägerlösung behandelt. Weiterhin unterzog man sie am Tag 5 (30 Minuten vor Reexposition), 6 und 7 einer intraperitonealen Antikörperbehandlung. Diese ist mit anti-*huCD4* Antikörpern (**A**- MAX16H5, **C**- MAX12F6) und den dazugehörigen Isotypkontrollen (**B**- MOP-C21, **D**- UPC-10) durchgeführt worden.

3.5.2 MAX16H5 und MAX12F6 depletieren unterschiedliche THZ Subpopulationen

Jeweils 7 sensibilisierten *huCD4/DR3*-Mäusen wurden an den Tagen 5, 6 und 7 je 15 $\mu\text{g/g}$ Körpergewicht MAX16H5 bzw. MAX12F6 injiziert. Jeweils 2 Tiere wurden mit den zugehörigen Isotyp-Kontrollantikörpern MOPC21 (IgG1) und UPC10 (IgG2a) behandelt. Am Tag 5 wurde die DTH ausgelöst. Für FACS-Analysen wurde den Tieren an den Tagen -10; 8 und 26 Peripherblut aus dem Retroorbitalplexus entnommen.

Die FACS-Daten für Tag -10 dienten als Ausgangswerte (100%). Die Analyseergebnisse für Tage 8 und 26 werden für jedes Tier auf den Ausgangswert bezogen (**Abb. 18**).

Sowohl MAX16H5 als auch MAX12F6 führen zu einer deutlichen Reduktion der *huCD4* Expression am Tag 8 (MAX16H5: $61 \pm 17\%$, $p_{d8} = 0,0009$, MAX12F6 $14 \pm 3\%$,

$p_{d8} = 1,59 \cdot 10^{-8}$). Am Tag 26 wurden höhere Expressionslevel registriert. In der mit MAX16H5 behandelten Gruppe betrug der Expressionslevel $84 \pm 9\%$ (Unterschied zu Ausgangswert nicht signifikant). In der MAX12F6 Gruppe blieb der Expressionslevel signifikant erniedrigt (MAX12F6 $33 \pm 0,7\%$, $p_{d26} = 0,005$). Im Vergleich zu MAX16H5 führte MAX12F6 zu beiden Analysezeitpunkten zu signifikant niedrigeren Expressionsleveln ($p_{d8} = 0,0003$, $p_{d26} = 0,005$).

Beide Antikörper reduzierten den Anteil der zirkulierenden TH-Zellen im Peripherblut. MAX16H5 reduzierte die TH-Zellen am Tag 8 geringfügig (MAX16H5: $76 \pm 16\%$, $p_{d8} = 0,007$). MAX12F6 führte zu einer Absenkung auf $15 \pm 4\%$ ($p_{d8} = 7,49 \cdot 10^{-8}$). Bis zum Tag 26 stieg der TH-Zell Anteil in der MAX16H5 Gruppe nahezu bis auf den Ausgangswert (MAX16H5: $82 \pm 12\%$, $p_{d26} = 0,11$). In der MAX12F6 Gruppe blieben die TH-Zellen signifikant erniedrigt ($31 \pm 0,3\%$, $p_{d26} = 0,002$). Im Vergleich zu MAX16H5 führte MAX12F6 zu beiden Zeitpunkten zu signifikant geringeren TH-Zellzahlen in der Zirkulation ($p_{d8} = 2,97 \cdot 10^{-5}$, $p_{d26} = 0,01$).

Am Tag 8 war die CD4-Expression nach Isotyp-Behandlung leicht erhöht ($115 \pm 3\%$ nach MOPC21; $123 \pm 3\%$ nach UPC10; Unterschiede nicht signifikant). Der Anteil zirkulierender TH-Zellen war leicht erhöht ($107 \pm 2\%$ nach MOPC21; $116 \pm 11\%$ nach UPC10).

Zum Tag 26 hin sanken in der MOPC21 Gruppe die CD4-Expression auf $90 \pm 6\%$, der Anteil TH-Zellen $92 \pm 3\%$. Unter UPC10 Behandlung sanken sowohl die CD4 Expression als auch der Anteil zirkulierender TH-Zellen, verblieben aber mit $115 \pm 21\%$ bzw. $108 \pm 14\%$ über den Ausgangswerten. Für die Unterschiede konnte keine Signifikanz nachgewiesen werden.

Der Anteil CD8+ T-Zellen war nach MAX16H5 und MAX12F6 Applikation am Tag 8 signifikant erhöht ($143 \pm 30\%$, $p_{d8} = 0,02$ bzw. $141 \pm 22\%$, $p_{d8} = 0,005$). Danach sank in beiden Gruppen der Anteil der CD8+ T-Zellen, sodass am Tag 26 kein signifikanter Unterschied zum Ausgangswert feststellbar war (MAX16H5: $115 \pm 13\%$, $p_{d26} = 0,35$, MAX12F6: $131 \pm 24\%$, $p_{d26} = 0,32$).

Nach MOPC21 und DNFB Behandlung sank der Anteil zirkulierender CD8+ T-Zellen auf $91 \pm 28\%$ und erhöhte sich bis Tag 26 auf $154 \pm 16\%$. UPC10 führte an beiden Untersuchungstagen zu erhöhten Werten ($112 \pm 9\%$ bzw. $126 \pm 4\%$).

Die peripheren NK-Zellen waren am Tag 8 unter MAX16H5 und MAX12F6 Behandlung signifikant erhöht ($153 \pm 23\%$, $p_{d8} = 0,001$, bzw. $202 \pm 37\%$, $p_{d8} = 0,01$). MAX12F6 führte zu einem signifikant höheren Anteil an NK Zellen ($p_{d8} = 0,02$). Für

Tag 26 wurden keine signifikanten Unterschiede gegenüber den Ausgangswerten festgestellt (MAX16H5: $94 \pm 14\%$, $p_{d26} = 0,53$, MAX12F6: $129 \pm 36\%$, $p_{d26} = 0,30$).

Unter MOP-C21 stieg der Anteil NK Zellen $169 \pm 42\%$ gegenüber dem Ausgangswert (Tag 8) und fiel auf $71,4 \pm 1\%$ am Tag 26 ($p_{d26} = 0,02$). Nach UPC-10 stieg der Anteil auf $137 \pm 18\%$ und fiel auf $47 \pm 5\%$ am Tag 26 ($p_{d26} = 0,04$).

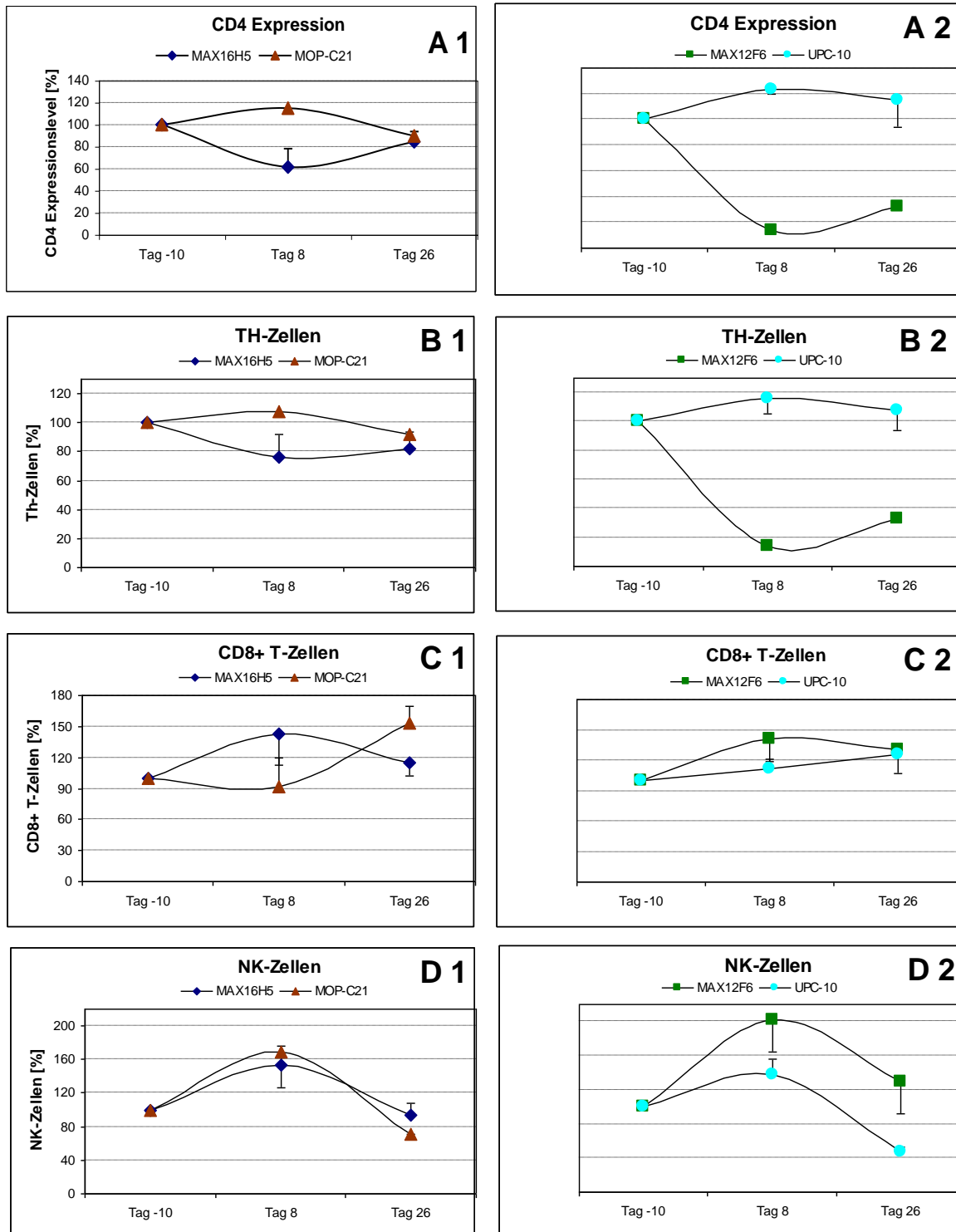


Abb. 18: MAX16H5 Behandlung während der Auslösungsphase einer Kontaktallergie führt zu einer Downmodulation des huCD4 Moleküls

Den mit den verschiedenen Antikörpern behandelten Mäusen wurde an den Tagen -10, 8 und 26 Peripherblut entnommen, und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Untersucht wurden Th-, CD8+, NK- Zellen und die CD4 Expression auf den TH-Zellen. Dargestellt sind die Werte in Prozent der Ausgangswerte.

Weitere FACS-Analysen dienten der Frage, ob bestimmte TH-Zell Subpopulationen unterschiedlich stark von anti-*hu*CD4-mAk vermittelten Depletion betroffen sind. Dazu wurden die Oberflächenantigene CD62L (Marker für naive TH-Zellen) und CD25 (Marker für aktivierte TH-Zellen) analysiert (Swain et al. 1996). Die Anteile wurden auf die Ausgangswerte (Tag -10; =100%) bezogen (**Abb. 19**).

Am Tag 8 führte MAX16H5 zu einer geringeren Reduktion der CD25 positiven TH-Zellen (MAX16H5: $89 \pm 5\%$, $p_{d8} = 0,0168$) als MAX12F6 ($70 \pm 10\%$, $p_{d8} = 0,0007$). Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war signifikant ($p_{d8} = 0,001$). Am Tag 26 waren keine signifikanten Unterschied zum Ausgangswert (MAX16H5: $91 \pm 5\%$, $p_{d26} = 0,09$, MAX12F6 $85 \pm 13\%$, $p_{d26} = 0,17$) bzw. zwischen den Behandlungsgruppen feststellbar ($p_{d26} = 0,45$).

Die CD62L positiven TH-Zellen wurden durch beide Antikörper am Tag 8 signifikant erniedrigt (MAX16H5: $53 \pm 11\%$, $p_{d8} = 0,0003$, MAX12F6 $69 \pm 15\%$, $p_{d8} = 0,004$). Am Tag 26 erreichten die CD62L positiven TH-Zellen nahezu den Ausgangswert (MAX16H5: $99 \pm 3\%$, $p_{d26} = 0,63$, MAX12F6 $93 \pm 3\%$, $p_{d26} = 0,07$).

Nach Injektion der beiden Isotypkontrollantikörper MOP-C21 und UPC-10 war der Anteil CD62L positiver TH-Zellen zu beiden Analysezeitpunkten kaum verändert (MOPC21: d8 $96 \pm 3\%$, d26 $96 \pm 4\%$, UPC10: d8 $99 \pm 3\%$, d26 $103 \pm 5\%$). Die Unterschiede in den CD25 positiven TH-Zellen waren nicht signifikant (MOPC21: d8 $91 \pm 3\%$, d26 $98 \pm 1\%$, UPC10: d8 $99 \pm 7\%$, d26 $104 \pm 1\%$).

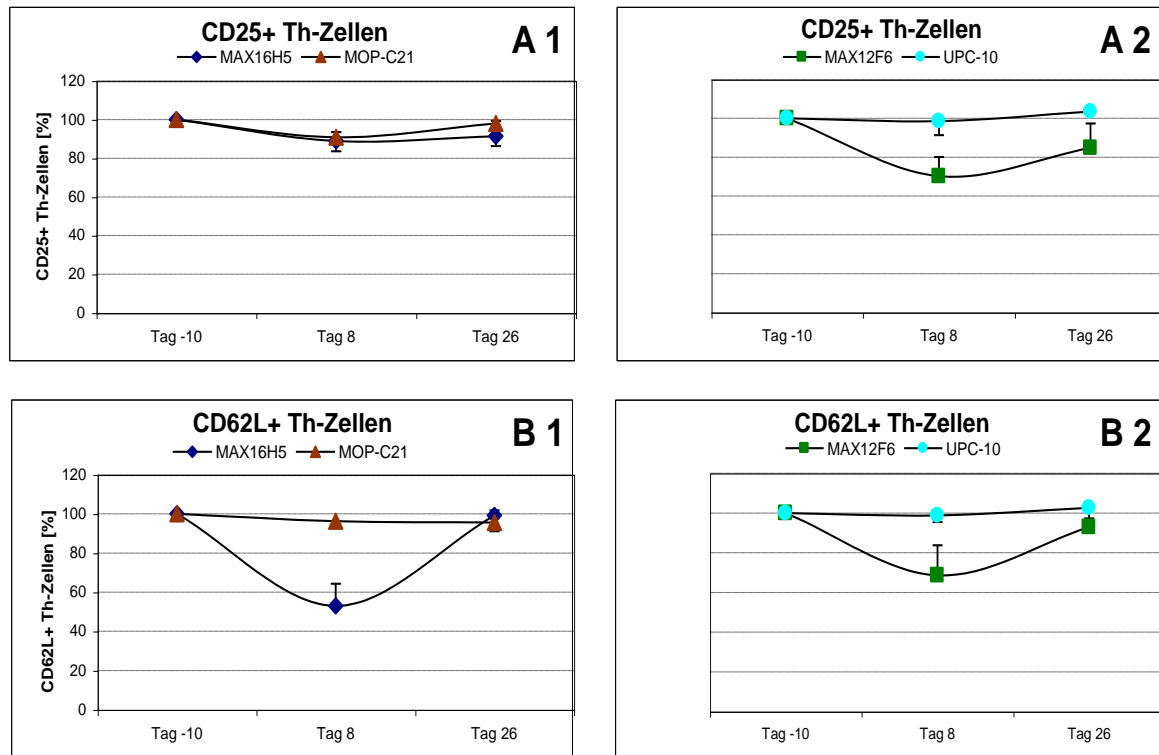


Abb. 19: MAX16H5 und MAX12F6 führen zu einer Reduktion der CD62L positiven/CD25 positiven TH-Zellen

Den mit Antikörper behandelten Mäusen wurde an den Tagen -10, acht und 26 Peripherblut entnommen, und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Innerhalb dieser Analysen wurde auch der Aktivitätszustand der CD4+ T-Zellen mittels der Oberflächenmarker CD25 und CD62L bestimmt.

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methoden

In der hier vorliegenden Arbeit wurde ein multipel transgenes Mausmodell verwendet. Die Tiere exprimieren humanes CD4 und eine Version des HLA-DR3 in einem *mucd4*-defizientem genetischen Hintergrund. Phänotypische Analysen, welche durch Laub et al. (2000) durchgeführt wurden, zeigten im Vergleich zum Menschen ein ähnliches Verteilungsmuster für *huCD4*, was unter vergleichbaren Mausmodellen einzigartig ist. Es konnte nachgewiesen werden, dass das murine *cd4* exakt durch *huCD4* ersetzt wurde. So konnten anhand der Oberflächenmoleküle zwei T-Zell Kompartimente klar voneinander getrennt werden, wobei eines nur *muCD8* und das zweite nur *huCD4* exprimiert. Darüber hinaus wird in der *huCD4/DR3* Maus das *huCD4* auf antigenpräsentierenden Zellen gefunden, ebenso wie es der Fall beim Menschen ist. So zeigten durchflusszytometrische Analysen von Milzzellsuspensionen eine Expression auf Monozyten und dendritischen Zellen. Das transgene HLA-DR3 Molekül wird größtenteils mit dem murinen I-A/I-E koexprimiert, jedoch wurden kleine Subpopulationen gefunden, welche nicht HLA-DR3 positiv sind aber murines MHC II exprimieren. Dies betrifft jedoch alle Leukozytenpopulationen zu ähnlichen Anteilen, sodass die Antigenpräsentation nicht gestört sein sollte. Laub et al. (2002) zeigte auch, dass diese transgenen Mäuse zur Ausbildung humoraler Immunantworten gegen Tetanustoxoid (TT) befähigt sind.

Diese Tiere bieten die einzigartige Möglichkeit, anti-*huCD4*-Antikörper vor ihrem Einsatz in der humanen Therapie in einem transgenen Mausmodell intensiv zu studieren. Es ist anzumerken, dass der Einfluss der endogenen MHC II Moleküle sich auf die Immunantworten der transgenen Tiere verschieden auswirken könnte. Die Tiere entstammten der achten bis elften Inzuchtgeneration. Der genetische Hintergrund war somit (noch) nicht vollständig homogen und beinhaltet neben dem humanen HLA-DR3 MHC-Elemente der Mausstämme C57/BL6 (Haplotyp H-2^b) und SJL (Haplotyp H-2^s).

Die Haltung der Mäuse erfolgte in Käfigen mit maximal 4 Tieren, um einem Rangverhalten entgegenzuwirken. Sie wurden unter keimarmen Bedingungen gehalten und behandelt, um Infektionen vorzubeugen. Da davon ausgegangen werden muss, dass es aufgrund der Antikörperbehandlung zu einer temporären

Immunsuppression in den *huCD4/DR3*-Mäusen kommt. Subklinische, unspezifische Infektionen der Tiere waren nicht sicher auszuschließen und könnten eine mögliche Fehlerquelle darstellen.

Es muss davon ausgegangen werden, dass sowohl die Blutentnahmen als auch die entnommene Blutmenge und die damit verbundene notwendige Narkotisierung der Mäuse Stressfaktoren sind, was zu einer möglichen Veränderung der Immunreaktion führt. Um dem entgegenzuwirken, wurden so wenige Blutentnahmen wie nötig durchgeführt. Dabei wurde nur soviel Blut entnommen, dass die erforderliche Zellzahl gerade für die FACS-Analysen ausreichte. Damit war das Risiko verbunden, dass eventuelle Nachbestimmungen nur eingeschränkt möglich waren.

Eine Fehlerquelle liegt auch in der Bestimmung der Ohrdicken mittels Außentaster „Oditest“; dennoch ist es eine generell anerkannte Methode zur Messung der DTH-Reaktion. Zum einen führt die Messung an unterschiedlichen Stellen des Ohres zu differierenden Ergebnissen, andererseits kommt es aufgrund der gefederten Lagerung des Tastarms zu einem leichten Druck auf das dazwischen liegende Gewebe, was insbesondere bei wiederholten Messungen zur örtlichen Reduktion des Ödems führt. Demgegenüber scheint die wiederholte mechanische Reizung bei der Messung zu einer Schwellung zu führen. Des Weiteren bestehen natürliche, individuelle Unterschiede zwischen den Ohrdicken (**Abb.1**). Das wirft insgesamt die Frage auf, inwieweit die Messungen an der einzelnen Maus reproduzierbar und mit anderen Tieren vergleichbar sind. Deshalb wurde zur Verbesserung der Vergleichbarkeit die Ohrdickenänderung berechnet. Darüber hinaus wurde der Gesamtverlauf beurteilt und das Maximum der gemittelten Ohrdickenänderung je Versuchsgruppe bestimmt.

Nach der intraperitonealen Injektion von MAX16H5 oder MAX12F6 erfolgt die Resorption bzw. passive Aufnahme der mAk durch das die Bauchhöhle auskleidende Peritoneum. Darüber gelangen die mAk in das Blut und werden in die verschiedenen Organe bzw. lymphatischen Kompartimente verteilt. Jedoch sind individuelle Unterschiede in der Kinetik von Resorption und Distribution nicht sicher auszuschließen. Die Alternative zur intraperitonealen Injektion wäre die intravenöse Injektion in die Schwanzvene, die jedoch ein höheres Stressniveau darstellt und mehrfache Injektionen erschwert (Hämatombildung).

Durch die Behandlung ist es möglich, dass das *huCD4*-Molekül nach Antikörperbindung downmoduliert wird, d.h. nicht mehr vollständig bzw. gar nicht auf

der Zelloberfläche erscheint. In diesem Fall sind die CD4⁺ TH-Zellen mittels Durchflusszytometrie nicht mehr verifizierbar. Um dieses Problem zu umgehen, wurden in der vorliegenden Arbeit die CD3⁺/CD8⁻ T-Zellen als CD4⁺ TH-Zellen bezeichnet.

Zur Bildgebung mit radionuklid-markierten Antikörperfragmenten ist anzumerken, dass die Szintigramme mittels einer Gamma-Kamera aufgezeichnet wurden, die für die Untersuchung am Menschen konzipiert ist. Da die Gamma-Kameras auf wesentlich größere Objekte abgestimmt sind, ist die Auflösung muriner Strukturen begrenzt. Weiterhin ist die Auswertesoftware auf die Untersuchung am Menschen abgestimmt, sodass detaillierte und differenzierte Aufnahmen der Tiere nur unter optimalen Bedingungen möglich waren. So mussten Kompartimente mit hoher Aktivität (Niere, Leber, Injektionsstelle an der Schwanzvene) mittels Blei abgeschirmt werden, um z.B. die Entzündung in den Mausohren darstellen zu können.

4.2 Validierung eines DTH Modells in der *huCD4/DR3* tripel transgenen Maus

Basierend auf ihrer Funktion und dem sezernierten Zytokinprofil werden CD4⁺ TH-Zellen in zwei Subpopulationen unterteilt. Sogenannte TH2 Zellen unterstützen vorwiegend die Antikörperbildung durch die Produktion der Typ-2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10. Dagegen ist die TH1-Reaktion gekennzeichnet durch zytotoxische und proinflammatorische Typ-1-Zytokine (IFN- γ , IL-2 und LT) und wird in Verbindung mit zellulären Immunantworten gebracht (Mosmann et al. 1989, Ricci et al. 1994, Kapp et al. 1995). Die charakteristischen Zytokinprodukte der TH1- (IFN- γ) und TH2-Zellen (IL-10, IL-4) wirken inhibierend auf die Differenzierung und Effektorfunktionen des gegensätzlichen Phänotyps (Fiorentino et al. 1989, Mosmann et al. 1989).

Die Kontaktallergie oder delayed type hypersensitivity (DTH) ist eine durch TH1-Zellen vermittelte Immunreaktion, die mit der Sezernierung von IFN- γ einhergeht (Cher et al. 1987, Yamamura et al. 1991) und sich im Mausmodell durch IL-10 inhibieren lässt (Enk und Katz 1995). Die DTH ist MHC-restringiert, haptenspezifisch und erreicht ihr Maximum im Mausmodell nach 24 – 48 Stunden (Gell und Benacerraf 1961). Sie entspricht einer allergischen Reaktion vom Typ IV nach Gell

und Coombs. Darüber hinaus betrifft sie ca. 3% der Bevölkerung und stellt damit die am häufigsten auftretende Form der Dermatose dar.

In den hier dargestellten Versuchen konnte gezeigt werden, dass sich an *huCD4/DR3*-tripel-transgenen-Mäusen eine DTH-Reaktion gegen DNFB induzieren lässt. Diese ist im Verlauf vergleichbar mit der in Wildtyp-Mäusen (Balb/c, C57/BL6). So erreichte die Gewebsschwellung in allen drei Mausstämmen nach 48 Stunden ihr Maximum, ihre Ausprägung fiel allerdings unterschiedlich aus. An C57/BL6- und transgenen-Tieren ließen sich ähnlich starke Reaktionen induzieren, während Balb/c-Mäuse eine geringere Reaktion zeigten. Die Ursache hierfür ist, dass Balb/c-Mäuse vermehrt TH2-Antworten ausbilden, während C57/BL6-Tiere zu TH1-Reaktionen neigen (Sadick et al. 1986, Güler et al. 1996). So verlaufen Leishmania Infektion in Balb/c-Mäusen fatal, da ihnen die Fähigkeit fehlt, eine IL-12-induzierte TH1-Antwort zu entwickeln (Güler et al. 1996). In Balb/C wurde auch eine signifikant niedrigere IFN- γ -Produktion als in C57/BL6 nachgewiesen (Sugaya et al. 1999).

Das hier etablierte DTH-Modell erwies sich als valide und robust, da nur geringe Schwankungen der Messwerte innerhalb Versuchsgruppen zu verzeichnen waren. Verschiedene Experimentatoren kamen zu vergleichbaren Messergebnissen (siehe Regressionsgerade; **Abb. 2**). Die Ohrdickenänderung nach Induktion einer DTH gegen DNFB betrug ein Vierfaches der maximalen Schwankungen der Einzelmessungen unbehandelter Ohren. Die Reaktion auf DNFB ist spezifisch, da nur nach einer stattgefunden Sensibilisierung eine signifikante Ohrschwellung durch Zweitkontakt in einem bestimmten Zeitfenster ausgelöst werden kann. In sensibilisierten Tieren konnten mit Trägerlösung (Aceton/Olivenöl) allein keine oder nur geringgradige Ohrschwellungen ausgelöst werden. Umgekehrt konnten mit DNFB keine wesentlichen Ohrschwellungen induziert werden, wenn die Tiere nicht sensibilisiert waren. Die geringen Reaktionen auf DNFB oder das Vehikel allein sind als irritativ-toxische Komponente der jeweiligen Substanz oder als mechanische Irritation zu werten. Zusammenfassend bestätigen diese Kontrollexperimente, dass die DTH-Reaktion gegen DNFB in der *huCD4/DR3*-Maus haptenpezifisch, reproduzierbar und valide ist (**Abb. 3**).

4.3 Eine Verzögerung der Auslösung führt zu einer schwächer ausgeprägten Reaktion gegen DNFB

Um die Auswirkungen der anti-*hu*CD4-Behandlung auf die Sensibilisierungsphase zu überprüfen, musste der immunsupprimierende Effekt der mAk für die Auslösephase ausgeschlossen bzw. minimiert werden. Somit war der Zeitraum zwischen Sensibilisierung und Auslösung dahingehend zu optimieren, dass nach möglichst langem antigenfreiem Intervall (noch) messbare Ohrschwellungen ausgelöst werden können. Hierzu wurden Versuche mit ansteigendem antigenfreiem Intervall durchgeführt. Mit zunehmender Zeitspanne nahm die Stärke der DTH-Reaktion ab. Bei Auslösung am Tag 33 betrugen die durchschnittliche Schwellung im Messzeitraum noch 0,078mm. Als maximale Schwellung wurde 0,095mm erfasst. Es bleibt offen, wie lange die Sensibilisierung anhält, da längere antigenfreie Intervalle nicht untersucht wurden.

Obwohl die DTH schwächer ausfällt, unterliegt sie der gleichen Kinetik wie im Standardprotokoll. Die maximale Schwellung wird zwischen 24 und 48 Stunden erreicht. Eine mögliche Ursache für die schwächere DTH nach verlängerter Ruhephase könnte in einer verringerten Anzahl zirkulierender oder im Lymphknoten vorliegender IFN- γ -sezernierender CD8⁺ T-Zellen sein, was zu einem verzögerten oder verringerten Einstrom dieser ins Entzündungsgebiet führt. Diese Vermutung wird durch verschiedene Autoren bestätigt, die eine Korrelation zwischen Ausmaß der Kontaktallergie gegen DNFB und der Anzahl haptenspezifischer CD8⁺ T-Zellen mit IFN- γ -Produktion in den drainierenden Lymphknoten finden (Gorbachev und Fairchild 2004, Kish et al. 2005).

4.4 Eine wiederholte Auslösung führt zu einer stärkeren und länger anhaltenden Gewebsschwellung

Eine mehrfache Auslösung der DTH in sensibilisierten Mäusen führt zu einer verstärkten DTH-Reaktion. Zehn *hu*CD4/DR3-Mäuse wurden 26 Tage nach Sensibilisierung (d.h. 21 Tage nach Erstausslösung) nochmals mit DNFB orthotop exponiert. Zu diesem Zeitpunkt waren die Gewebsschwellungen bis zum Ausgangswert zurückgegangen. Die zweite Auslösung führte zu einem signifikant

länger anhaltenden und steileren Anstieg der Ohrdicke. Das Maximum der Ohrschwellung wurde erst nach 72 h erreicht und die Zunahme betrug zu diesem Zeitpunkt 0,396 mm im Mittel. Ursächlich für diese Beobachtungen könnte die Entwicklung einer chronisch-inflammatorischen Reaktion mit Entstehung von Akanthose, Hyperkeratose und interstitiellem Ödem sein, was Pichler et al. (2005) nach mehrfachem 2,4,6-Trinitrochlorobenzen Kontakt nachweisen konnten. Tatsächlich wurden an mehreren *huCD4/DR3*-Mäusen klinisch deutlich ausgebildete Verkrustungen und Fibrinbeläge beobachtet.

Zum Zusammenhang zwischen mehrfacher Auslösung in sensibilisierten Tieren und der Stärke der DTH-Reaktion gibt es verschiedene z.T. widersprüchliche Daten.

An Kühen konnte gezeigt werden, dass wiederholte Kontakte zu einer Reduktion der Reaktion gegen Tetanustoxoid führt, darüber hinaus wurde eine tendenziell erniedrigte IFN- γ -Sekretion beobachtet (Thom et al. 2004). Im Gegensatz dazu beschrieben Asherson und Ptak (1968) vergleichbare DTH-Reaktionen nach wiederholter Auslösung einer Oxazolon Kontaktallergie in Mäusen. Mit 2,4,6-Trinitrochlorobenzen wurde nach wiederholter Reexposition eine gesteigerte Reaktion, mit deutlicher Zunahme der Ohrdicken, beobachtet (Pichler et al. 2005, Kitagaki et al. 1997, Kitagaki et al. 1995). Wiederholter Kontakt führte zur Entwicklung einer chronisch inflammatorischen Reaktion, welche verbunden ist mit der Expression eines Typ-2-Zytokinmusters. So konnte eine Downregulation der IFN- γ -Produktion bei gleichzeitig upregulierter IL-4-Sekretion festgestellt werden (Kitagaki et al. 1997, Kitagaki et al. 1995). Des Weiteren zeigte sich, dass die chronische Entzündungsreaktion mit einem dichten zellulären Infiltrat und einer merklichen Vaskularisierung verbunden ist. Die Steigerung der Ohrdicken wurden auf die Entwicklung einer Akanthose, einer Hyperkeratose und eines interstitiellen Ödems zurückgeführt (Pichler et al. 2005).

4.5 Die Bedeutung der MHC II – CD4 Interaktion für die DTH

Während der Inzucht traten Segreganten auf, die kein *huCD4*, kein HLA-DR3 oder keines dieser Transgene enthielten. In diesen Tieren ist der physiologische Aktivierungsweg für TH-Zellen grundlegend gestört. Sie dienen als genetisch veränderte Modelle zur Untersuchung des DTH-Mechanismus. An allen diesen

Tieren konnte trotz gestörter CD4-MHC II-Interaktion eine Kontaktallergie ausgelöst werden.

An CD4 KO Mäusen trat eine signifikant länger anhaltende DTH-Reaktion ein. Die maximale Ohrschwellung wurde nicht nach 48 (wie bei den Kontrolltieren), sondern erst nach 96 Stunden erreicht. Interessanterweise war die irritativ-toxische Reaktion gegen DNFB in nicht sensibilisierten Tieren ebenfalls stärker. Beide Befunde lassen vermuten, dass in den CD4 KO Mäusen Mechanismen fehlen, die die immunologische bzw. irritative-toxische Reaktion auf DNFB gegenregulieren, wobei diese in den CD4 exprimierenden Zellen vorliegen müssen.

In der Literatur liegen unterschiedliche Daten zum Ablauf der DTH-Reaktion in Tieren mit veränderter oder fehlender *mucd4*-Expression vor.

In *mucd4*-defizienten C57/BL6-Mäusen war die DTH gegen DNFB erniedrigt, konnte aber durch Transfer von *mucd4*⁺ TH-Zellen aus sensibilisierten C57/BL6-Mäusen teilweise rekonstituiert werden (Kondo et al. 1997, Saint-Mezard et al. 2005). Die Autoren führten dies auf eine wichtige Effektorfunktion der *mucd4*⁺ TH-Zellen oder eine mangelhafte Aktivierung (fehlendes IFN- γ) der CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen zurück. Der Unterschied zu den hier beschriebenen Daten könnte im anderen genetischen Hintergrund für CD4 KO Mäuse (HLA-DR3, Maus MHC II Moleküle H-2^b und H-2^s, siehe 4.1) begründet sein, der ein anderes Selektionsmuster im Thymus und damit Unterschiede in der Regulation zellulärer Immunantworten (Anteil und Reaktivität der Treg, Zytokinmuster nach Aktivierung) bedingt.

In transgenen Tieren, die *mucd4* sekretieren und nicht membranständig exprimieren (sCD4-Mäuse), wurde eine signifikant erniedrigte DTH-Reaktionen gegen ein Proteinantigen (Bovines serum albumin, BSA) beschrieben (Wang et al. 2000). Nach Neutralisierung des löslichen *mucd4* mit einem mAk war die DTH wieder vergleichbar mit Wildtyp-Mäusen. Offensichtlich stört die Besetzung der nicht polymorphen Bereiche der MHC II Moleküle durch lösliches *mucd4* die Initiierung von DTH Effektormechanismen, wobei die IFN- γ -Sekretion eine entscheidende Rolle spielt.

Dagegen wurde für methyliertes bovines Serumalbumin eine unveränderte DTH in CD4 KO Mäusen beschrieben (Wang et al. 2000). Offensichtlich hängt der Einfluss der CD4 TH-Zellen auch von der Natur des Antigens ab.

Auch in MHC II (HLA-DR3) KO Mäusen konnte eine DTH-Reaktion gegen DNFB ausgelöst werden wobei diese mit CD4 KO Tieren vergleichbar war. Die Gewebsschwellung hielt länger an, die maximale Ohrschwellung wurde ebenfalls erst

nach 96 Stunden erreicht. Auch in diesen Mäusen war eine stärkere irritativ-toxische Reaktion gegen DNFB in den nicht sensibilisierten Kontrolltieren nachweisbar.

Schließlich stand eine Maus zur Verfügung, welche weder *huCD4* noch DR3 exprimierte (CD4 KO/MHC II KO Maus), ihr fehlten beide zur Antigenpräsentation notwendigen Liganden. Auch an diesem Tier wurde eine Kontaktallergie gegen DNFB induziert und es zeigte sich eine stärkere und verlängerte DTH-Reaktion im Vergleich zu *huCD4*/DR3 Tieren.

Auch in anderen MHC II-defizienten Mausmodellen, welche auch eine verringerte Anzahl von CD4⁺ TH-Zellen hatten, konnte eine Kontaktallergie ausgelöst werden, die im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen deutlich stärker verlief (Bour et al. 1995, Bouloc et al. 1998, Saint-Mezard et al. 2005). Trotz fehlenden MHC II wird eine geringe Anzahl *mucd4*-exprimierender THZ in die Zirkulation entlassen, unter denen sich ein beträchtlicher Anteil Treg befinden muss. Wenn die wenigen *mucd4*⁺ TH-Zellen durch mAk depletiert werden, kommt es zu einer weiteren Verstärkung der Ohrschwellung und einem länger anhaltenden Verlauf (Kish et al. 2007).

Die funktionelle Bedeutung haptenspezifischer CD4⁺ TH1-Zellen und CD8⁺ zytotoxischer T1-Zellen ist noch nicht abschließend geklärt. So sehen mehrer Autoren in den CD4⁺ TH1-Zellen die Effektorzellen für die Induktion einer Kontaktallergie (Kapsenberg et al. 1992, Fujisawa et al. 1994, Miller S.D. und Jenkins M.K. 1985).

Wie oben dargestellt, vertreten mehrere Autoren die Hypothese dass CD4⁺ TH-Zellen vorwiegend regulatorische und CD8⁺ T-Zellen Effektorfunktionen ausüben. Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Experimente unterstützen diese Hypothese. Eine Sensibilisierung gegen DNFB und die Auslösung einer DTH kann ohne Aktivierung von CD4⁺ TH-Zellen erfolgen. Somit ist es möglich, dass die DTH-Reaktion nur durch haptenspezifische, MHC I restringierte CD8⁺ zytotoxische T-Zellen vermittelt werden kann.

4.6 Sensibilisierungs- und Auslösungsphase werden durch anti-*huCD4*-mAk beeinflusst, wobei Epitop und Isotyp von Bedeutung sind

Zunächst wurde untersucht, wie anti-*huCD4* in der Sensibilisierungsphase wirkt. Dazu wurden *huCD4*/DR3 Mäuse an drei aufeinander folgenden Tagen mit

anti-*hu*CD4-mAk behandelt, wobei die letzte i. p. Injektion 30 Minuten vor dem erstmaligen Haptenkontakt (Tag 0) stattfand. Damit der mAk die Auslösungsphase möglichst nicht beeinflusst, erfolgte die Auslösung erst am Tag 26. Bis zur Auslösung am Tag 26 war der verfügbare Antikörper weitgehend abgebaut.

Die DTH-Reaktion wird nur unwesentlich beeinflusst, wenn die Sensibilisierung in Gegenwart von anti-*hu*CD4 stattfindet. Für MAX12F6 wurde lediglich 24 und 48 Stunden nach Auslösung eine geringfügige aber signifikante Verringerung der Ohrschwellung erfasst. Die DTH an MAX16H5 behandelten Tieren war im gesamten Verlauf leicht aber signifikant verringert (Signifikanz gegenüber Isotyp-Kontrollen und unbehandelten Tieren).

Demgegenüber wird berichtet, dass ein anti CD4 mAk während der Sensibilisierung die DTH gegen DNFB deutlich reduziert (Miller und Jenkins 1985). Allerdings verwendeten die Autoren einen depletierenden Antikörper. Auch könnte die Ak-Behandlung durchaus auch auf die Auslösung wirken, da diese nach Standardprotokoll und nicht nach Einhaltung eines längeren antigenfreien Intervalls erfolgte, in dem der Ak-Titer sinkt. Eine reduzierte DTH mit verringerter IFN- γ -Produktion wurde sowohl mit depletierenden als auch nicht-depletierenden anti-CD4-mAk in einem DTH-Modell mit Oxazolone erhalten (Podolin 2000). Allerdings war auch in diesen Experimenten kein längeres Intervall zwischen anti-CD4-Behandlung (Sensibilisierung) und der Auslösung beachtet worden.

Andere Autoren berichten, dass depletierende mAk während der Sensibilisierung die DTH verstärken können (Gocinski und Tigelaar 1990, Xu et al. 1996, Xu et al. 1997, Akiba et al. 2002, Gorbachev und Fairchild 2004).

Diese widersprüchlichen Daten verweisen darauf, dass das Epitop von entscheidender funktioneller Bedeutung ist. Weiterhin kann angenommen werden, dass der genetische Background verschiedener Mausstämme von Bedeutung ist.

Im Vergleich zur Sensibilisierungsphase waren die Effekte von anti-*hu*CD4-mAk während der Auslösungsphase wesentlich deutlicher.

Verglichen mit der DTH an unbehandelten Kontrollen wurde nach MAX12F6-Behandlung eine deutlich stärkere und vor allem länger anhaltende Gewebsschwellung beobachtet. Die Kontrollgruppe mit Isotyp-Behandlung enthielt nur 2 Tiere, daher konnte keine Signifikanz nachgewiesen werden. Interessanterweise war der DTH-Verlauf vergleichbar mit dem in CD4 KO oder MHC II KO Mäusen. In diesen Tieren hielt die Schwellung merklich auch bis zu 192h

nach Haptenkontakt an. Die stärkere Depletion durch MAX12F6 könnte die ähnliche Situation zu den Knock out Tieren erklären und auf die Bedeutung von TH-Zellen als regulatorisches Element hinweisen.

Im Gegensatz zu MAX12F6 war die Schwellung in MAX16H5 behandelten Tieren deutlich schwächer und kürzer anhaltend. Nahezu im gesamten Messzeitraum war eine signifikant reduzierte Gewebsschwellung im Vergleich sowohl zur Isotypkontrollgruppe als auch zur unbehandelten Kontrollgruppe zu beobachten. Es wurden 48h nach Auslösung lediglich 0,096mm Ohrdickenzunahme erreicht. Der Verlauf war vergleichbar mit der irritativ-toxischen Wirkung von DNFB an nicht sensibilisierten Mäusen.

Gegensätzliche Wirkungen auf die DTH-Reaktion werden auch von anderen Autoren für verschiedene anti-CD4-Antikörper berichtet (Podolin 2000, Gocinski und Tigelaar 1990, Xu et al. 1996, Xu et al. 1997, Akiba et al. 2002, Gorbachev und Fairchild 2004). Die gegensätzlichen DTH-Verläufe werden mit dem unterschiedlichen Depletionsverhalten von MAX16H5 und MAX12F6 erklärbar, die mit den FACS-Analysen nachgewiesen wurden. Offensichtlich weisen verschiedenen TH-Zellsubpopulationen eine unterschiedliche Sensibilität gegenüber der jeweiligen mAk Behandlung auf. Möglicherweise werden von MAX16H5 regulatorische Zellen verschont bzw. sogar durch den mAk induziert (Mischke, 2007). MAX12F6 mit stärkerem Depletierungspotenzial könnte gerade diese Zellen eliminieren, so dass der DTH-Reaktion nicht ausreichend gegenreguliert werden kann.

Wie die Kontaktallergie basieren viele Autoimmunerkrankungen auf TH1-vermittelten Reaktionen. Tatsächlich existieren Berichte, dass in bestimmten Tiermodellen für Autoimmunerkrankungen eine anti-CD4-Behandlung positiv therapeutische Effekte bewirkt. Mit nicht-depletierenden mAk konnte gezeigt werden, dass in Tiermodellen von Rheumatoid Arthritis (Chu und Londei 1996, Mauri et al. 1997), Multipler Sklerose (Biasi et al. 1997), Typ 1 Diabetes mellitus (Hutchings et al. 1992) und systemischem Lupus erythematoses (Wofsy und Seaman 1985) ein Fortschreiten der Erkrankung verhindert wird. Des Weiteren konnte MAX16H5 im Mausmodell Toleranz gegen Tetanustoxoid erzeugen (Laub et al. 2001).

Anti-*hu*CD4-Ak wurden bereits in Therapieversuchen am Menschen geprüft. Zum Beispiel wurde MAX16H5 an Patienten mit Rheumatoider Arthritis und chronisch entzündlichen Darmerkrankung eingesetzt (Emmrich, F. et al. 1991, Emmrich, J. et al. 1995). Für beide Erkrankungen sind Immunantworten vom funktionellen TH1-Typ

bekannt, die die positiven therapeutischen Effekte der Antikörperbehandlung begründen.

4.7 CD4 als innovatives Target zur molekularen Bildgebung der chronischen Entzündung mittels ^{111}In markierten MAX16H5-Fab Fragmenten

Für ^{111}In markierte F(ab)- und F(ab')₂-Fragmente des anti-*hu*CD4-mAk MAX16H5 konnte szintigraphisch eine Anreicherung in den physiologischen Kompartimenten mit hohem TH-Zell-Anteil nachgewiesen werden. Die Anreicherung war spezifisch, da in genetischen Varianten ohne *hu*CD4 (CD4 KO Mäuse) nur Signale für Nieren und Leber erhalten wurden. Diese Organe dienen der Elimination des Radiodiagnostikums.

Spezifische Anreicherungen in lymphatischen Kompartimenten fand auch Rubin (1996) für ^{111}In -markiertes anti-Maus cd4 (mAk GK1.5) in C57/BL6-Mäusen. Im Gamma-Counter zeigte sich eine 10 bis 20-fach höhere Aktivität in Milz und Lymphknoten im Vergleich zu solchen Tieren, in denen das murine cd4 ausgeknockt war (*mucd4* KO Maus). Darüber hinaus zeigte die Bildgebung mittels Gammakamera nach 24h und 45h eine deutliche Anreicherung des radioaktiv markierten mAk in den Lymphknoten und der Milz von normalen jedoch nicht von CD4 KO Mäusen (Rubin et al. 1996).

In der Kontaktallergie können *mucd4*+ TH-Zellen in hoher Anzahl in den drainierenden Lymphknoten sensibilisierter Mäuse nachgewiesen werden (Gautam et al. 1991). Kapsenberg et al. (1992) zeigten weiterhin, dass der überwiegende Teil haptenspezifischer TZ, welche aus Läsionen von Nickel und Kobalt Kontaktallergien gewonnen wurden, CD4+ THZ sind.

Mit dem vorliegenden Entzündungsmodell (DTH gegen DNFB) konnte die spezifische Anreicherung ^{111}In -markierten F(ab)-Fragmente und damit von *hu*CD4 in den entzündlichen Läsionen nachgewiesen werden. Die Untersuchung des Ohrgewebes im Gamma-Counter zeigte deutliche Unterschiede zwischen rechten (DTH-) und linken (Kontrollohr) Ohren von *hu*CD4/DR3-Mäusen. Die Signale sind eindeutig auf die Anwesenheit *hu*CD4-exprimierender Zellen im Entzündungsgebiet zurückzuführen, da in Kontrolltieren ohne *hu*CD4 (CD4 KO) keine Unterschiede zwischen rechten (DTH) und linken (Kontrolle) Ohren gefunden wurden.

Mit ^{111}In markierten F(ab')_2 -Fragmenten wurde keine spezifische Anreicherung in der DTH Läsion gefunden. Sowohl in *huCD4/DR*-Mäusen als auch in *CD4 KO* Tieren, denen das Target fehlt, wurde in den Ohren mit DTH eine höhere Aktivität als in den zugehörigen Kontrollohren gemessen. Der Unterschied zwischen Fab und F(ab')_2 kann auf die unspezifische Anreicherung von F(ab')_2 -Fragmenten im Ödem der chronischen Entzündungsreaktion zurückgeführt werden. Kinne et al. (1995) zeigte ebenfalls, dass sich F(ab) -Fragmente besser zur Szintigraphie eignen, da sie im Vergleich zu komplettem mAk ein deutlich günstigeres Blut – Gewebe Verteilungsmuster haben. Für die Verwendung von Fab-Fragmenten spricht auch, dass ungebundenes F(ab) rasch renal eliminiert wird und sich nicht unspezifisch anreichern kann. F(ab')_2 -Fragmente werden in der Leber abgebaut, wodurch sie länger im Organismus verweilen, dadurch einen hohen Background verursachen und mit bildgebenden Verfahren interferieren (hoher Background, hohe Lebersignale, siehe **Abb. 12**).

anti-*huCD4* F(ab) -Fragmente sind somit ein neuartiges potenzielles Diagnostikum für TH-Zell-medierte Entzündungen, die mit Hilfe der medizinischen Bildgebung (Szintigraphie) lokalisiert werden können. Etablierte Verfahren zur Detektion von Entzündungen sind zum Beispiel ^{111}In markierte Leukozyten, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ markiertes humanes Immunglobulin und (^{18}F) Fluordesoxyglucose. Mittels ^{18}F -Galacto-RGD kann spezifisch die Expression von $\alpha_v\beta_3$ Integrin dargestellt werden. RGD Peptide sind zyklische Peptide, welche die Aminosäuresequenz Arginin-Glyzin-Aspartat (R-G-D) enthalten. Es konnte durch PET Bildgebung gezeigt werden, dass radioaktiv markiertes $\alpha_v\beta_3$ Integrin spezifisch in chronischen Entzündungsherden angereichert und damit nachweisbar ist (Pichler et al. 2005).

Mittels dieser Präparate lässt sich mehr oder weniger spezifisch eine inflammatorische Reaktion nuklearmedizinisch darstellen. Mit anti-*huCD4*-mAk dagegen wird die TH-Zelle als Initiator und Regulator chronischer Entzündungen sichtbar gemacht. Dadurch kann das Verfahren Entzündungsreaktionen darstellen, bevor diese zu klinischen Symptomen führen und eignet sich deshalb u.a. zur Frühdiagnostik chronisch-entzündlicher Erkrankungen.

4.8 Induktion regulatorischer T-Zellen durch MAX16H5

Mittels Flowzytometrie wurden mögliche zelluläre Ursachen für die verschiedenen Verläufe der DTH nach Ak-Behandlung in der Sensibilisierungsphase oder der Auslösungsphase untersucht. Dazu wurden an peripheren mononukleären Zellen die CD4-Expressionslevel und die Zusammensetzung peripherer T-Zellen analysiert.

Sowohl MAX16H5 als auch MAX12F6 führten zu einer erniedrigten CD4-Expression im Vergleich zu den Ausgangswerten (Tag-10). Dieser als Modulation bezeichnete Effekt auf die Bindung von Liganden an das CD4 Molekül war im weiteren Verlauf rückläufig, wobei die Ausgangswerte bis zum Tag 26 nicht wieder erreicht wurden. In MAX12F6-behandelten Tieren lagen die CD4 Expressionslevel niedriger als in den MAX16H5-behandelten Tieren.

Der Modulation wirken mindestens zwei zelluläre Reaktionen entgegen: Einerseits führt IgG zu einer Erhöhung der CD4 Expression, wobei der Isotyp von MAX16H5, IgG1 einen stärkeren Effekt hatte als der von MAX12F6, IgG2a. Andererseits führt die Stimulation der TH-Zellen zu erhöhter CD4 Expressionen. *In vitro* wurden nach 96h dreifach erhöhte Expressionslevel nachgewiesen (Ridgeway 1998). Die in Summe beobachtete erniedrigte CD4 Expression kann eine Ursache für veränderte DTH-Reaktionen darstellen, da insbesondere die Interaktion mit APZ gestört wird.

Auch für humane THZ wurde die Modulation für beide Ak nachgewiesen. Bereits 20h nach Ak-Behandlung wird die maximale Modulation bei *in vitro* kultivierten humanen naiven THZ erreicht (Mischke 2007). Für MAX16H5 wurde Modulation auch *in vivo*, d.h. unter therapeutischen Bedingungen nachgewiesen (Horneff et al. 1993).

Beide Antikörper führten zur Reduktion zirkulierender THZ, dabei wurde für MAX12F6 hat ein deutlich stärkeres depletierendes Potenzial festgestellt. Am Tag 26 wurde für beide AK eine Regeneration der THZ nachgewiesen. In MAX12F6-behandelten Tieren erfolgte die Regeneration in einem wesentlich geringeren Ausmaß.

Die Depletierung durch MAX16H5 war während der Sensibilisierung umfassender als während der Auslösung. Zum Zeitpunkt der Sensibilisierung liegen vorwiegend naive THZ vor, da die Tiere unter Barrierebedingungen gehalten wurden (keine immunogenen oder infektiösen Expositionen). Offensichtlich wirkt MAX16H5 stärker auf diese Zellen. Dagegen liegt in der Auslösungsphase, oder Akutphase der

Kontaktallergie, ein hoher Anteil voraktivierter, DNFB spezifischer T-Zellen vor, die möglicherweise weniger sensibel für eine MAX16H5-induzierte Depletion sind.

Naive und voraktivierte THZ können in der Maus u.a. anhand ihrer CD62L- (L-Selektin) und CD25- (IL-2Rezeptor, α -Kette) Expression unterschieden werden. CD62L vermittelt das sogenannte homing von naiven THZ in die Lymphknoten. Treffen sie auf ihr „Nominalantigen“, werden sie aktiviert und exprimieren CD25, wodurch sie IL-2 als Wachstumsfaktor nutzen können. Naive THZ sind demnach CD62L+/CD25- während aktivierte THZ CD62L-/CD25+ sind (Swain et al. 1996).

Nach MAX16H5-Applikation zeigte sich eine rapide Abnahme CD62L+ THZ jedoch nur eine geringe Abnahme der CD25+ THZ. Im Gegensatz dazu führt MAX12F6 zu einer rapiden und vergleichbaren Reduktion sowohl der CD62L+ als auch der CD25+ THZ. Die Expression der beiden Oberflächenmarker normalisierte sich weitestgehend in allen Behandlungsgruppen. In den beiden Isotypkontrollgruppen konnten Veränderung in der Expression dieser Oberflächenmarker nicht beobachtet werden.

Unter den verbleibenden CD25+ THZ nach MAX16H5 könnten regulatorische T-Zellen sein (Treg). Zellen mit dauerhafter und sehr hoher CD25 Expression repräsentieren eine Subpopulation mit regulatorischen Eigenschaften (Treg, Kuniyasu et al. 2000). Für Treg konnte gezeigt werden, dass sie die Aktivierung und Proliferation antigenspezifischer T-Zellen unterdrücken und damit eine regulierende Wirkung bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen *in vivo* haben (Sakaguchi et al. 1995, Li et al. 2007). Möglicherweise ist CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4), welches vor allem auf CD25+ TH-Zellen gefunden wird, für die Hemmung der antigenspezifischen Aktivierung und Proliferation notwendig (Takahashi, T. et al. 2000), jedoch könnten CD25+ THZ ihre regulatorische Funktion auch ohne CTLA-4 erfüllen (Kataoka et al. 2005). Bei künstlich herbeigeführtem Mangel von CD25+ TH-Zellen, deren Anteil etwa 5 – 10 % am THZ Kompartiment beträgt, konnte eine verstärkte Entwicklung von Autoimmunkrankheiten beobachtet werden (Itoh et al. 1999). Zusätzlich konnten Itoh et al. (1999) zeigen, dass *in vitro* durch IL-2 und anti CD28 mAk CD25+ THZ ihre immunsupprimierende Funktion verlieren können.

Auch für die Regulation der Kontaktallergie sind Treg von Bedeutung. So konnten in der Auslösungsphase CD25+ TH-Zellen isoliert werden, welche *in vitro* die

Proliferation von CD8⁺ TZ vermindern können und IL-2 für diese regulatorische Funktion benötigen. Zusätzlich konnte *in vivo* die Ausprägung und die Dauer der Kontaktallergie durch CD25⁺ TZ begrenzt werden (Kish et al. 2005, Kish et al. 2007). Eine Rolle bei der Vermittlung der regulatorischen Wirkung CD25⁺ THZ scheint daneben IL-10 zu spielen (Hara et al. 2001).

Es konnte nachgewiesen werden, dass CD25⁺ TH-Zellen nach Behandlung mit anti-*hu*CD4-mAk und Immunisierung mit einem Alloantigen aus CD25⁻ THZ thymusunabhängig in der Peripherie generiert werden (Karim et al. 2004). In der eigenen Arbeitsgruppe wurde nachgewiesen, dass aus naiven humanen THZ durch Behandlung mit MAX16H5 regulatorische THZ (CD25^{high}) generiert werden, die z.B. die Allo-MLR inhibierten (Mischke 2007).

Die FACS-Analysen zeigen, dass MAX16H5 vorwiegend naive THZ depletiert und CD25⁺ THZ verschont. Wenn die verbleibenden CD25⁺ THZ die antigenspezifischen Effektorzellen sind, dürfte die DTH-Reaktion im Vergleich zu den Kontrollen nicht verändert sein. Die Tatsache jedoch, dass eine verminderte Reaktion eintritt, wenn die Auslösung unter MAX16H5 erfolgt, verweist darauf, dass durch den mAk regulatorische THZ induziert werden können. In weiterführenden Untersuchungen sollten diese mittels Fox/p3 identifiziert werden. Ein geeigneter mAk zur FACS Analyse stand zum Zeitpunkt der experimentellen Arbeiten leider nicht zur Verfügung.

Für MAX12F6 konnte kein inhibitorischer Effekt gefunden werden. Der DTH-Verlauf unter MAX12F6 war vergleichbar mit dem in CD4 defizienten Tieren. In beiden Modellen fehlen die CD4⁺ THZ die sowohl antigenspezifische Effektorzellen als auch regulatorische Zellen umfassen. Der foudroyante DTH-Verlauf nach MAX12F6-Behandlung wird vornehmlich durch CD8⁺ Effektorzellen bestimmt, die nicht durch adäquate zelluläre Mechanismen reguliert werden kann (Bour et al. 1995, Boulloc et al. 1998, Saint-Mezard et al. 2005, Kish et al. 2007).

Die Analyse der CD8⁺ T-Zellen 24h nach letztmaliger Ak-Injektion zeigte dass sowohl MAX16H5 als auch MAX12F6 einen relativen Anstieg dieser Zellpopulation bewirkte. Zum einen verringert sich die Anzahl CD4⁺ exprimierender Zellen durch Depletion, andererseits könnten sich der Anteil CD8 exprimierender Zellen erhöhen, da diese als Effektorzellen in der Auslösungsphase benötigt werden (Gorbachev und Fairchild 2004)

Darüber hinaus konnte in den Experimenten auch eine Zunahme der NK-Zellen nachgewiesen werden. Ob diese eine Bedeutung für die DTH besitzen, ist nicht bekannt.

5 Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.

Das humane CD4 Molekül als Zielstruktur zur therapeutischen Beeinflussung
zellulärer Immunantworten in einem transgenen Tiermodell

eingereicht von Stefan Köhler

angefertigt an der Universität Leipzig
am Institut für Klinische Immunologie und
Transfusionsmedizin (Max-Bürger-Forschungszentrum)

betreut von Prof. Dr. med. F. Emmrich und
Dr. rer. nat. R. Laub

Einreichung 07/2014

In der vorliegenden Arbeit wurde das immunmodulatorische Potenzial der monoklonalen Antikörper MAX16H5 (Maus-IgG1) und MAX12F6 (Maus-IgG2a) untersucht, die nicht-kompetitiv an unterschiedlichen Epitopen des humanen CD4-Moleküls binden. Die *in vivo* Untersuchungen wurden durch ein mehrfach transgenes Mausmodell (*huCD4/DR3*-Maus) ermöglicht, in dem das murine *cd4* durch humanes CD4 orthotop ersetzt und HLA-DR3 als natürlicher Ligand eingeführt war. Als Modell für T-Zell-medierte Immunantworten wurde ein DTH Modell mit DNFB als Kontaktallergen etabliert und validiert. Eine einmalige lokale DNFB-Exposition an der Bauchhaut führte zur Sensibilisierung der Tiere, so dass nach erneutem DNFB-Kontakt nach 5 Tagen am Ohr eine spezifische Entzündungsreaktion ausgelöst wurde. Diese war in Ausmaß und Verlauf mit der DTH-Reaktion in etablierten Mausstämmen (Balb/c bzw. C57/BL6, „Wildtyp“) vergleichbar. Eine Auslösung später als 5 Tage nach Sensibilisierung führte zu einer Verringerung der DTH, die mit der Länge des DNFB-freien Intervalls korrelierte. Eine wiederholte Auslösung führte zu einer signifikant stärkeren und länger anhaltenden

DTH-Reaktion charakterisiert durch Akanthose, Hyperkeratose und interstitielles Ödem.

Die Bedeutung der Interaktion zwischen HLA-DR und *huCD4* für die Regulation der DTH wurde mit genetischen Varianten des *huCD4/DR3*-Mausmodells nachgewiesen. In Abwesenheit von *huCD4* bzw. HLA-DR3 wurde eine stärkere und vor allem länger anhaltende Gewebsschwellung gemessen. Außerdem zeigten diese Tiere eine starke irritativ-toxische Reaktion bereits nach einmaligem DNFB-Kontakt. Diese Befunde zeigen, dass CD8⁺ zytotoxische T-Zellen ohne Hilfe von CD4⁺ TH-Zellen aktiviert werden und die DTH bei gestörter CD4-MHC II-Interaktion nicht ausreichend reguliert werden kann.

Eine anti-*huCD4*-Behandlung während der Sensibilisierungsphase führte zu einer deutlichen (MAX16H5) bzw. geringfügigen (MAX12F6) Verringerung der DTH-Reaktion.

Dagegen waren die Effekte der beiden Antikörper auf die Auslösungsphase gegensätzlich. Die Behandlung mit MAX16H5 bewirkte eine deutlich verringerte Gewebsschwellung. MAX12F6 führte zu einer deutlich verstärkten sowie länger anhaltenden Schwellung während der DTH-Reaktion.

Mittels Durchflusszytometrie wurde gezeigt, dass beide mAk periphere TH-Zellen depletieren und die CD4-Expression erniedrigen (Modulation). MAX12F6 führte zu einer deutlich stärkeren Depletion von TH-Zellen wobei naive und voraktivierte (CD62L⁻, CD25⁺) THZ gleichermaßen betroffen waren. Durch MAX16H5 sind vor allem naive (CD62L⁺, CD25⁻) TH-Zellen von der Depletion betroffen. MAX16H5-Behandlung führt somit zur relativen Zunahme CD4⁺CD25⁺ TH-Zellen, innerhalb der sich auch CD25^{high} regulatorische (Treg) Zellen befinden, während MAX12F6 diese Subpopulation auch vermindert. Diese unterschiedlichen Effekte der beiden mAk erklären die teilweise gegensätzlichen Verläufe der DTH-Reaktion. Durch den anteiligen Verlust von Treg unter MAX12F6-Behandlung kann die DTH nicht ausreichend gegenreguliert werden. Eine stärkere und länger anhaltende Entzündungsreaktion sind die Folge.

Für MAX16H5 werden subtile zelluläre Effekte gesehen, die in einer präferentiellen Depletierung naiver THZ, der Verschonung voraktivierter THZ inklusive Treg oder der Induktion von Treg aus naiven THZ bestehen könnten. Da die Veränderungen im peripheren TH-Zell Kompartiment mit einer verminderten DTH-Reaktion einhergehen, spielen mit hoher Wahrscheinlichkeit die Verstärkung zellulär regulativer

Mechanismen und insbesondere die Zunahme der Treg Subpopulation die entscheidende Rolle.

In der Arbeit wird weiterhin erstmalig gezeigt, dass das CD4-Molekül ein besonders geeignetes diagnostisches Target zum molekularen Imaging der chronischen Entzündungsreaktion darstellt. Die Injektion ^{111}In markierter MAX16H5 F(ab)-Fragmente führt zur spezifischen Anreicherung in den DTH-Läsionen, die mittels Szintigraphie lokalisiert und quantifiziert werden kann.

Zusammengenommen zeigen die experimentellen Daten, dass MAX16H5 klinische Relevanz für künftige immunmodulatorische Therapien hat sowie für die diagnostische Bildgebung der chronischen Entzündung prädestiniert ist.

6 Literaturverzeichnis

Aiba, S. and Katz, S. I.: Phenotypic and functional characteristics of in vivo-activated Langerhans cells. *J. Immunol.* 1990, 145(9): 2791-2796

Akiba, H., Kehren, J., Ducluzeau, M. T., Krasteva, M., Horand, F., Kaiserlian, D., Kaneko, F., Nicolas, J. F.: Skin inflammation during contact hypersensitivity is mediated by early recruitment of CD8+ T cytotoxic 1 cells inducing keratinocyte apoptosis. *J. Immunol.* 2002, 168: 3079-3087

Anderson, C., Hehr, A., Robbins, R., Hasan, R., Athar, M., Mukhtar, H., Elmetts, C. A.: Metabolic requirements for induction of contact hypersensitivity to immunotoxic polyaromatic hydrocarbons. *J. Immunol.* 1995, 155(7): 3530-3537

Asherson, G. L. and Ptak, W.: Contact and delayed Hypersensitivity in the mouse. I. Active sensitization and passiv transfer. *Immunology* 1968, 15(3): 405-416

Baldari, C. T., Milia, E., Di Somma, M. M., Baldoni, F., Valitutti, S., Telford, J. L.: Distict signaling identify functionally different CD4 epitopes. *Eur. J. Immunol.* 1995, 25: 1843-1850

Benjamin, R. J. and Waldmann, H.: Induction of tolerance by monoclonal antibody therapy. *Nature* 1986, 320(6061): 449-451

Biasi, G., Facchinetti, A., Monastra, G., Mezzalira, S., Sivieri, S., Tavalato, B., Gallo, P.: Protection from experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): non-depleting anti-CD4 mAb treatment induces peripheral T-cell tolerance to MBP in PL/J mice. *J. Neuroimmunol.* 1997, 73(1-2): 117-123

Blum, M. D., Wong, G. T., Higgins, K. M., Sunshine, M. J., Lacy, E.: Reconstitution of the subclass-specific expression of CD4 in thymocytes and peripheral T cells of transgenic mice: identification of a human CD4 enhancer. *J. Exp. Med.* 1993, 177: 1343-1358

Bouloc, A., Cavani, A., Katz, S. I.: Contact hypersensitivity in MHC class II-deficient mice depends on CD8 T lymphocytes primed by immunostimulating Langerhans cells. *J. Invest. Dermatol.* 1998, 111(1): 44-49

Bour, H., Peyron, E., Gaucherand, M., Garrigue, J. L., Desvignes, C., Kaiserlian, D., Revillard, J. P., Nicolas, J. F.: Major histocompatibility complex class I-restricted CD8+ T cells and class II-restricted CD4+ T cells, respectively, mediate and regulate contact sensitivity to dinitrofluorobenzene. *Eur. J. Immunol.* 1995, 25: 3006-3010

Carrel, S., Lamarre, D., Isler, P., Rapin, C., Fleury, S., Salvi, S., Sekaly, R. P., Cerottini, J. C.: A positive signal is transduced via surface CD4 molecules. *Res. Immunol.* 1989, 140: 545-561

Carrel, S., Salvi, S., Gallay, P., Rapin, C., Sekaly, R. P.: Positive signal transduction via surface CD4 molecules does not need coexpression of the CD3/TcR complex. *Res. Immunol.* 1991, 142: 97-108

Carteron, N. L., Wofsy, D., Seaman, W. E.: Induction of immune tolerance during administration of monoclonal antibody to L3T4 does not depend on depletion of L3T4+ cells. *J. Immunol.* 1988, 140 (3): 713-716

Cavani, A., Hackett, C. J., Wilson, K. J., Rothbard, J. B., Katz, S. I.: Characterization of epitopes recognized by hapten-specific CD4+ T cells. *J. Immunol.* 1995, 154: 1232-1238

Cavani, A., Mei, D., Guerra, E., Corinti, S., Giani, M., Pirrotta, L., Puddu, P., Girolomoni, G.: Patients with allergic contact dermatitis to nickel and nonallergic individuals display different nickel-specific T cell responses. Evidence for the presence of effector CD8+ and regulatory CD4+ T cells. *J. Invest. Dermatol.* 1998, 111(4): 621-628

Chen, Z. K., Cobbold, S. P., Waldmann, H., Metcalfe, S.: Amplification of natural regulatory immune mechanisms for transplantation tolerance. *Transplantation* 1996, 62(9): 1200-1206

Cher, D. J. and Mosmann, T. R.: Two types of murine helper T cell clone. II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by TH1 clones. *J. Immunol.* 1987, 138(11): 3688-3694

Cobbold, S. P., Jayasuriya, A., Nash, A., Prospero, T. D., Waldmann, H.: Therapy with monoclonal antibodies by elimination of T-cell subsets in vivo. *Nature* 1984, 312(5994): 548-551

Dupuis, G. and Benezra C.: Allergic contact dermatitis to simple chemicals: a molecular approach. New York: Marcel Dekker, 1982

Dupuis, G., Benezra, C., Schlewer, G., Stampf, J. L.: Allergic contact dermatitis to α -methylene-g-butyrolactones. Preparation of alantolactone-protein conjugates and induction of contact sensitivity in the guinea pig by an alantolactone-skin protein conjugate. *Mol. Immunol.* 1980, 17: 1045-1051

Emmrich, F., Greger, B., Eichmann, K.: A cross-reacting human idiotype (B17) associated with antibodies to N-acethyl-D-glucosamine. Specificity, immunoglobulin class association, and distribution in the population. *Eur J Immunol.* 1983, 13(4): 273-278

Emmrich, F., Horneff, G., Becker, W., Lüke, W., Potocnik, A., Kanzy, U., Kalden, J. R., Burmester, G.: An anti-CD4 antibody for treatment of chronic inflammatory arthritis. *Agents. Actions. Suppl.* 1991, 32: 165-170

Emmrich, J., Seyfarth, M., Fleig, W. E., Emmrich, F.: Treatment of inflammatory bowel disease with anti-CD4 monoclonal antibody. *Lancet* 1991, 338(8766):570-571

Emmrich, J., Seyfarth, M., Liebe, S., Emmrich, F.: Anti-CD4 antibody treatment in inflammatory bowel disease without a long CD4+-cell depletion. *Gastroenterol.* 1995, 108: A815

Emmrich, F., Strittmatter, U., Eichmann, K.: Synergism in the activation of human CD8 T cells by cross linking the T cell receptor complex, with the CD8 differentiation antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1986, 83: 8298-8304

- Engemann, T. M., Gorbachev, A. V., Gladue, R. P., Heeger, P. S., Fairchild, R. L.:** Inhibition of functional T cell priming and contact hypersensitivity responses by treatment with anti-secondary lymphoid chemokine antibody during hapten sensitization. *J. Immunol.* 2000, 164: 5207-5214
- Enk, A. H.:** Allergic contact dermatitis: understanding the immune response and potential for targeted therapy using cytokines. *Mol. Med. Today* 1997, 3(10): 423-428
- Enk, A. H. and Katz, S. I.:** Contact sensitivity as a model for T-cell activation. *J. Invest. Dermatol.* 1995, 105: 80S-83S
- Fehr, B. S., Takashima, A., Matsue, H., Gerometta, J. S., Bergstresser, P. R., Cruz, P. D. Jr.:** Contact sensitization induces proliferation of heterogeneous populations of hapten-specific T cells. *Exp. Dermatol.* 1994, 3: 189-197
- Fujisawa, H., Kondo, S., Wang, B., Shivji, G. M., Sauder, D. N.:** The role of CD4 molecules in the induction phase of contact hypersensitivity cytokine profiles in the skin and lymph nodes. *Immunology* 1996, 89: 250-255
- Gaspari A. A., Katz S. I.:** Contact hypersensitivity. *Current protocols in immunology* 2001May; Chapter 4: Unit 4.2
- Gautam, S. C., Matriano, J. A., Chikkala, N. F., Edinger, M. G., Tubbs, R. R.:** L3T4 (CD4+) cells that mediate contact sensitivity to trinitrochlorobenzene express I-A determinants. *Cell. Immunol.* 1991, 135(1): 27-41
- Gell, P. G. H. and Benacerraf, B.:** Studies on hypersensitivity. IV. The relationship between contact and delayed sensitivity: a study on the specificity of cellular immune reactions. *J. Exp. Med.* 1961, 113: 571-585
- Gocinski, B. L. and Tigelaar, R. E.:** Roles of CD4+ and CD8+ T cells in murine contact sensitivity revealed by in vivo monoclonal antibody depletion. *J. Immunol.* 1990, 144(11): 4121-4128
- Gorbachev, A. V. and Fairchild, R. L.:** CD4+ T cells regulate CD8+ T cell-mediated cutaneous immune responses by restricted effector T cell development through a Fas ligand-dependent mechanism. *J. Immunol.* 2004, 172: 2286-2295
- Grabbe, S. and Schwarz, T.:** Immunoregulatory mechanisms involved in elicitation of allergic contact hypersensitivity. *Immunol Today* 1998, 19(1): 37-44
- Güler, M. L., Gorham, J. D., Hsieh, C. S., Mackey, A. J., Steen, R. G., Dietrich, W. F., Murphy, K. M.:** Genetic susceptibility to Leishmania: IL-12 responsiveness in Th1 cell development. *Science* 1996, 271(5251): 984-987
- Guse, A. H., Roth, E., Bröker, B. M., Emmrich, F.:** Complex inositol polyphosphate response induced by co-cross-linking of CD4 and Fcγ receptors in the human monocytoïd cell line U937. *J. Immunol.* 1992, 149(7): 2452-2458
- Guse, A. H., Tsygankov, A. Yu., Bröker, B. M., Roth, E., Emmrich, F.:** Signal transduction in T lymphocytes and monocytes: effects of the anti-CD4 antibody MAX16H5. *Year Immunol.* 1993, 7: 175-181

- Hanna, Z., Simard, C., Laperriere, A., Jolicoeur, P.:** Specific expression of the human CD4 gene in mature CD4⁺ CD8⁻ and immature CD4⁺ CD8⁺ T cells and in macrophages of transgenic mice. *Mol. Cell. Biol.* 1994, 14(2): 1084-1094
- Hara, M., Kingsley, C. I., Niimi, M., Read, S., Turvey, S. E., Bushell, A. R., Morris, P. J., Powrie, F., Wood, K. J.:** IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens in vivo. *J. Immunol.* 2001, 166: 3789-3796
- Hauser, C.:** Cultured epidermal Langerhans cells activate effector T cells for contact sensitivity. *J. Invest. Dermatol.* 1990, 95(4): 436-440
- Hauser, C.:** The interaction between Langerhans cells and CD4⁺ T cells. *J. Dermatol.* 1992, 19(11): 722-725
- Horneff, G., Guse, A. H., Schulze-Koops, H., Kalden, J. R., Burmester, G. R., Emmrich, F.:** Human CD4 modulation in vivo induced by antibody treatment. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1993, 66(1): 80-90
- Hutchings, P., O'Reilly, L., Parish, N. M., Waldmann, H., Cooke, A.:** The use of a non-depleting anti-CD4 monoclonal antibody to re-establish tolerance to b cells in NOD mice. *Eur. J. Immunol.* 1992, 22: 1913-1918
- Itoh, M., Takahashi, T., Sakaguchi, N., Kuniyasu, Y., Shimizu, J., Otsuka, F., Sakaguchi, S.:** Thymus and autoimmunity: production of CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J. Immunol.* 1999, 162: 5317-5326
- Janeway, C. A. Jr., Rojo, J., Saizawa, K., Dianzani, U., Portoles, P., Tite, J., Haque, S., Jones, B.:** The co-receptor function of murine CD4. *Immunol. Rev.* 1989, 109: 77-92
- Kalish, R. S. and Johnson, K. L.:** Enrichment and function of urushiol (Poison ivy)-specific T lymphocytes in lesions of allergic contact dermatitis to urushiol. *J. Immunol.* 1990, 145(11): 3706-3713
- Kapp, A. and Werfel, T.:** Allergic inflammation: skin. *Allergy.* 1999, 54 Suppl 56: 23-4
- Kapsenberg, M. L., Wierenga, E. A., Stiekman, F. E. M., Tiggeleman, A. M. B. C., Bos, J. D.:** Th1 lymphokine production profiles of nickel-specific CD4⁺ T-lymphocyte clones from nickel contact allergic and non-allergic individuals. *J. Invest. Dermatol.* 1992, 98: 59-63
- Karim, M., Kingsley, C. I., Bushell, A. R., Sawitzki, B. S., Wood, K. J.:** Alloantigen-induced CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells can develop in vivo from CD25⁻CD4⁺ precursors in a thymus-independent process. *J. Immunol.* 2004, 172: 923-928
- Kataoka, H., Takahashi, S., Takase, K., Yamasaki, S., Yokosuka, T., Koike, T., Saito, T.:** CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells exert in vitro suppressive activity independent of CTLA-4. *Int. Immunol.* 2005, 17(4): 421-427
- Katz, S. I., Aiba, S., Cavani, A., Enk, A. H.:** Early events in contact sensitivity. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1995, 378: 497-500

Kehren, J., Desvignes, C., Krasteva, M., Ducluzeau, M. T., Assossou, O., Horand, F., Hahne, M., Kägi, D., Kaiserlian, D., Nicolas, J. F.: Cytotoxicity is mandatory for CD8+ T cell-mediated contact hypersensitivity. *J. Exp. Med.* 1999, 189(5): 779-786

Killeen, N. and Littman, D. R.: The regulation and function of the CD4 coreceptor during T lymphocyte development. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1996, 205: 89-106

Killeen, N., Sawada, S., Littman, D. R.: Regulated expression of human CD4 rescues helper T cell development in mice lacking expression of endogenous CD4. *EMBO J.* 1993, 12(4): 1547-1553

Kinne, R. W., Schemer, K., Behr, T., Sharkey, R. M., Palombo – Kinne, E., Emmrich, F., Goldenberg, D. M., Wolf, F., Becker, W.: In vivo stability and metabolism of 99Tcm-labelled anti-CD4 monoclonal antibodies and Fab fragments. *J. Nucl. Med.* 1995 Dec, 36(12): 2268-2275

Kish, D. D., Gorbachev, A. V., Fairchild, R. L.: CD8+ T cells produce IL-2, which is required for CD4+CD25+ T cell regulation of effector CD8+ T cell development for contact hypersensitivity responses. *J. Leukoc. Biol.* 2005, 78: 725-735

Kish, D. D., Gorbachev, A. V., Fairchild, R. L.: Regulatory function of CD4+CD25+ T cells from class II MHC-deficient mice in contact hypersensitivity responses. *J. Leukoc. Biol.* 2007, 82(1): 85-92

Kitagi, H., Fujisawa, S., Watanabe, K., Hayakawa, K., Shiohara, T.: Immediate-type hypersensitivity response followed by a late reaction is induced by repeated epicutaneous application of contact sensitizing agents in mice. *J. Invest. Dermatol.* 1995, 105: 749-755

Kitagi, H., Ono, N., Hayakawa, K., Kitazawa, T., Watanabe, K., Shiohara, T.: Repeated elicitation of contact hypersensitivity induces a shift in cutaneous cytokine milieu from a T helper cell type 1 to a T helper cell type 2 profile. *J. Immunol.* 1997, 159: 2484-2491

Kolesaric, A., Stingl, G., Elbe-Bürger, A.: MHC class I+/II- dendritic cells induce hapten-specific immune responses in vitro and vivo. *J. Invest. Dermatol.* 1997, 109(4): 580-585

Kondo, S., Beissert, S., Wang, B., Fujisawa, H., Kooshesh, F., Stratigos, A., Granstein, R. D., Mak, T. W., Sauder, D. N.: Hyporesponsiveness in contact hypersensitivity and irritant contact dermatitis in CD4 gene targeted mouse. *J. Invest. Dermatol.* 1996, 106(5): 993-1000

Krasteva, M., Kehren, J., Ducluzeau, M. T., Sayag, M., Cacciapuoti, M., Akiba, H., Descotes, J., Nicolas, J. F.: Contact dermatitis. I. Pathophysiology of contact sensitivity. *Eur. J. Dermatol.* 1999, 1(9): 65-77

Krasteva, M., Kehren, J., Horand, F., Akiba, H., Choquet, G., Ducluzeau, M. T., Tedone, R., Garrigue, J. L., Kaiserlian, D., Nicolas, J. F.: Dual role of dendritic cells in the induction and down-regulation of antigen-specific cutaneous inflammation. *J. Immunol.* 1998, 160: 1181-1190

Krasteva, M., Kehren, J., Sayag, M., Ducluzeau, M. T., Dupuis, M., Kanitakis, J., Nicolas, J. F.: Contact dermatitis. II. Clinical aspects and diagnosis. *Eur. J. Dermatol.* 1999, 9(9): 144-159

Kripke, M. L., Munn, C. G., Jeevan, A., Tang, J. M., Bucana, C.: Evidence that cutaneous antigen-presenting cells migrate to regional lymph nodes during contact sensitization. *J. Immunol.* 1990, 145(9): 2833-2838

Kuniyasu, Y., Takahashi, T., Itoh, M., Shimizu, J., Toda, G., Sakaguchi, S.: Naturally anergic and suppressive CD25+CD4+ T cells as a functionally and phenotypically distinct immunoregulatory T cell subpopulation. *Int. Immunol.* 2000, 12(8): 1145-1155

Laub, R., Brecht, R., Dorsch, M., Valey, U., Wenk, K., Emmrich, F.: Anti-human CD4 induces peripheral tolerance in a human CD4+, murine CD4-, HLA-DR3+ advanced transgenic mouse model. *J. Immunol.* 2002, 169: 2947-2955

Laub, R., Dorsch, M., Meyer, D., Ermann, J., Hedrich, H. J., Emmrich, F.: A multiple transgenic mouse model with a partially humanized activation pathway for helper T cell response. *J. Immunol. Meth.* 2000, 246: 37-50

Laub, R., Dorsch, M., Wenk, K., Emmrich, F.: Induction of immunologic tolerance to tetanus toxoid by anti-human CD4 in HLA-DR3+/human CD4+/murine CD4- multiple transgenic mice. *Transpl. Proc.* 2001, 33: 2182-2183

Leahy, D. J.: A structural view of CD4 and CD8. *FASEB J.* 1995, 9(1): 17-25

Lehmann, M., Sternkopf, F., Metz, F., Brock, J., Döcke, W. D., Plantikow, A., Kuttler, B., Hahn, H. J., Ringel, B., Volk, H. D.: Induction of long-term survival of rat skin allografts by a novel, highly efficient anti-CD4 monoclonal antibody. *Transplantation* 1992, 54(6): 959-962

Lehmann, M., Graser, E., Risch, K., Hancock, W. W., Müller, A., Kuttler, B., Hahn, H. J., Kupiec-Weglinski, J. W., Brock, J., Volk, H. D.: Anti-CD4 monoclonal antibody-induced allograft tolerance in rats despite persistence of donor-reactive T cells. *Transplantation* 1997, 64(8): 1181-1187

Lepoittevin, J. P. and Leblond, I.: Hapten-peptide-T cell receptor interactions: molecular basis for the recognition of haptens by T lymphocytes. *Eur. J. Dermatol.* 1997, 7(3): 151-154

Levin, A. G., McDonough, E. F. Jr., Miller, D. G., Southam, C. M.: Delayed hypersensitivity response to DNFB in sick and healthy persons. *Ann. N Y Acad. Sci.* 1964, 120: 400-409

Li, J., Ridgway, W., Fathman, C. G., Tse, H. Y., Shaw, M. K.: High cell surface expression of CD4 allows distinction of CD4+CD25+ antigen-specific effector T cells from CD4+CD25+ regulatory T cells in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 2007 Dec, 192(1-2): 57-67

Li, L., Elliott, J. F., Mosmann, T. R.: IL-10 inhibits cytokine production, vascular leakage, and swelling during T helper 1 cell-induced delayed-type hypersensitivity. *J. Immunol.* 1994, 153: 3967-3977

Macatonia, S. E., Edwards, A. J., Knight, S. C.: Dendritic cells and the initiation of contact sensitivity to fluorescein isothiocyanate. *Immunol.* 1986, 59: 509-514

Macatonia, S. E., Knight, S. C., Edwards, A. J., Griffiths, S., Fryer, P.: Localization of antigen on lymph node dendritic cells after exposure to the contact sensitizer fluorescein isothiocyanate. *J. Exp. Med.* 1987, 166: 1654-1667

Macher, E. and Chase, M. W.: Studies on the sensitization of animals with simple chemical compounds. XI. The fate of labelled picryl chloride and dinitrochlorobenzene after sensitizing injections. *J. Exp. Med.* 1969, 129(1): 81-102

Mak, T. W., Rahemtulla, A., Schilham, M., Koh, D. R., Fung-Leung, W. P.: Generation of mutant mice lacking surface expression of CD4 or CD8 by gene targeting. *J. Autoimmun.* 1992, 5 Suppl A: 55-59

Mauri, C., Chu, C. Q. Q., Woodrow, D., Mori, L., Londei, M.: Treatment of a newly established transgenic model of chronic arthritis with nondepleting anti-CD4 monoclonal antibody. *J. Immunol.* 1997, 159: 5032-5041

Milia, E., Di Somma, M. M., Majolini, M. B., Olivieri, C., Somma, F., Piccolella, E., Telford, J. L., Baldari, C. T.: Gene activating and proapoptotic potential are independent properties of different CD4 epitopes. *Mol. Immunol.* 1997, 34(4): 287-296

Meyer, D., Laub, R., Dorsch, M., Thamm, B., Ermann, J., Lehmann, J., Hedrich, H. J., Emmrich, F.: Replacement of murine by human CD4 and introduction of HLA-DR in mice: A triple-transgenic animal model to study human MHC II-CD4 interaction in situ. *Immunobiol.* 1997, 197 2-4: 133-428

Miller, S. D. and Jenkins, M. K.: In vivo effects of GK1.5 (anti-L3T4a) monoclonal antibody on induction and expression of delayed-type hypersensitivity. *Cell. Immunol.* 1985, 92(2): 414-426

Motoyama, K., Arima, T., Yu, S., Lehmann, M., Flye, M. W.: The kinetics of tolerance induction by nondepleting anti-CD4 monoclonal antibody (RIB 5/2) plus intravenous donor alloantigen administration. *Transplantation* 2000, 69(2): 285-293

Newell, M. K., Haughn, L. J., Maroun, C. R., Julius, M. H.: Death of mature T cells by separate ligation of CD4 and the T-cell receptor for antigen. *Nature* 1990, 347(6290): 286-289

Orosz, C. G., Huang, E. H., Bergese, S. D., Sedmak, D. D., Birmingham, D. J., Ohye, R. G., van Buskirk, A. M.: Prevention of acute murine cardiac allograft rejection: anti-CD4 or anti-vascular cell adhesion molecule one monoclonal antibodies block acute rejection but permit persistent graft-reactive alloimmunity and chronic tissue remodelling. *J. Heart. Lung. Transplant.* 1997, 16(9): 889-904

Phanuphak, P., Moorhead, J. W., Claman, H. N.: Tolerance and contact sensitivity to DNFB in mice. I. In vivo detection by ear swelling and correlation with in vitro cell stimulation. *J. Immunol.* 1974, 112(1): 115-123

Pichler, B. J., Kneilling, M., Haubner, R., Braumüller, H., Schwaiger, M., Röcken, M., Weber, W.: Imaging of delayed-type hypersensitivity by PET and 18F-Galacto-RGD. *J. Nuc. Med.* 2005, 46(1): 184-189

Podolin, P. L., Webb, E. F., Reddy, M., Truneh, A., Griswold, D. E.: Inhibition of contact sensitivity in human CD4+ transgenic mice by human CD4-specific monoclonal antibodies: CD4+ T-cell depletion is not required. *Immunology* 2000, 99: 287-295

Qin, S., Cobbold, S., Tighe, H., Benjamin, R., Waldmann, H.: CD4 monoclonal antibody pairs for immunosuppression and tolerance induction. *Eur. J. Immunol.* 1987, 17(8): 1159-1165

Ravichandran, K. S., Collins, T. L., Burakoff, S. J.: CD4 and signal transduction. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1996, 205: 47-62

Ricci, M., Matucci, A., Rossi, O.: T cells, cytokines, IgE and allergic airways inflammation. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 1994, 4(5): 214-220

Roelen, D. L., Bushell, A. R., Niimi, M., Young, N. T., Rust, N. A., Morris, P. J., Wood, K. J.: Immunoregulation by CD4 T cells in the induction of specific immunological unresponsiveness to alloantigens in vivo: evidence for a reduction in the frequency of alloantigen-specific cytotoxic T cells in vitro. *Hum. Immunol.* 1998, 59(9): 529-539

Rubin, R. H., Baltimore, D., Chen, B. K., Wilkinson, R. A., Fischman, A. J.: In vivo tissue distribution of CD4 lymphocytes in mice determined by radioimmunosintigraphy with an 111In-labeled anti-CD4 monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996, 93(15): 7460-7463

Sad, S., Marcotte, R., Mosmann, T. R.: Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8+ T cells into cytotoxic CD8+ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines. *Immunity*. 1995, 2(3): 271-279

Sad, S. and Mosmann, T. R.: Single IL-2-secreting precursor CD4 T cell can develop into either Th1 or Th2 cytokine secretion phenotype. *J. Immunol.* 1994, 153: 3514-3522

Sadick, M. D., Locksley, R. M., Tubbs, C., Raff, H. V.: Murine cutaneous leishmaniasis: resistance correlates with the capacity to generate interferon-gamma in response to Leishmania antigens in vitro. *J. Immunol.* 1986, 136(2): 655-661

Saint-Mezard, P., Chavagnac, C., Vocanson, M., Kehren, J., Rozieres, A., Bosset, S., Ionescu, M., Dubois, B., Kaiserlian, D., Nicolas, J. F., Berard, F.: Deficient contact hypersensitivity reaction in CD4-/- mice is because of impaired hapten-specific CD8+ T cell function. *J. Invest. Dermatol.* 2005, 124: 562-569

Saitovich, D., Bushell, A., Mabbs, D. W., Morris, P. J., Wood, K. J.: Kinetics of induction of transplantation tolerance with a nondepleting anti-CD4 monoclonal antibody and donor-specific transfusion before transplantation: a critical period of time is required for development of immunological tolerance. *Transplantation* 1996, 61(11): 1642-1647

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., Toda, M.: Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL- receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 1995, 155: 1151-1164

Santamaria Babi, L. F., Picker, L. J., Perez Soler, M. T., Drzimalla, K., Flohr, P., Blaser, K., Hauser, C.: Circulating allergen-reactive T cells from patients with atopic dermatitis and allergic contact dermatitis express the skin-selective homing receptor, the cutaneous lymphocyte-associated antigen. *J. Exp. Med.* 1995, 181(5): 1935-1940

Schwarz, A., Grabbe, S., Mahnke, K., Riemann, H., Luger, T. A., Wysocka, M., Trinchieri, G., Schwarz, T.: Interleukin 12 breaks ultraviolet light induced immunosuppression by affecting CD8+ rather than CD4+ T cells. *J. Invest. Dermatol.* 1998, 110: 272-276

Scully, R., Qin, S., Cobbold, S., Waldmann, H.: Mechanisms in CD4 antibody-mediated transplantation tolerance: kinetics of induction, antigen dependency and role of regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.* 1994, 24(10): 2383-2392

Silberberg, I., Baer, R. L., Rosenthal, S.A.: The role of Langerhans cells in contact allergy. I. An ultrastructural study in actively induced contact dermatitis in guinea pigs. *Acta. Derm. Venereol.* 1974, 54(5): 321-331

Smith, C. H., Barker, J. N., Lee, T. H.: Adhesion molecules in allergic inflammation. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1993, 148(6 Pt 2): S75-78

Sugaya, M., Nakamura, K., Tamaki, K.: Interleukins 18 and 12 synergistically upregulate interferon- γ roduction by murine dendritic epidermal T cells. *J. Invest. Dermatol.* 1999, 113: 350-354

Sulzberger, M. B. and Kerr, P. S.: Trichophytin hypersensitiveness of urticarial type, with circulating antibodies and passive transference. *J. Allergy* 1930, 2(1): 11-16

Swain, S. L., Croft, M., Dubey, C., Haynes, L., Rogers, P., Zhang, X., Bradley, L. M.: From naive to memory T cells. *Immunol. Rev.* 1996, 150: 143-167

Takahashi, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Uede, T., Shimizu, J., Sakaguchi, N., Mak, T. W., Sakaguchi, S.: Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J. Exp. Med.* 2000, 192(2): 303-309

Takeshita, K., Yamasaki, T., Akira, S., Gantner, F., Bacon, K. B.: Essential role of MHC II-independent CD4+ T cells, IL-4 and STAT6 in contact hypersensitivity induced by fluorescein isothiocyanate in the mouse. *Int. Immunol.* 2004, 16(5): 685-695

Tamma, S. M. L., Chirmule, N., McCloskey, T. W., Oyaizu, N., Kalyanaraman, V. S., Pahwa, S.: Signals transduced through the CD4 molecule interfere with TCR/CD3-mediated ras activation leading to T cell anergy/apoptosis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1997, 85(2): 195-201

Thom, M., Morgan, J. H., Hope, J. C., Villareal-Ramos, B., Martin, M., Howard, C. J.: The effect of repeated tuberculin skin testing of cattel on immune response and

disease following experimental infection with *Mycobacterium bovis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2004, 102(4): 399-412

Trinchieri, G.: Biology of natural killer cells. *Adv. Immunol.* 1989, 47: 187-376

Turk, J. L.: Immunological mechanisms in the reaction between drugs and skin. *J. Clin. Path. Suppl. (R. Coll. Path.)* 1975,): 58-61

Waldmann, H.: Manipulation of T-cell responses with monoclonal antibodies. *Annu. Rev. Immunol.* 1989, 7: 407-444

Waldmann, H. and Cobbold, S.: How do monoclonal antibodies induce tolerance? A role for infectious tolerance? *Annu. Rev. Immunol.* 1998, 16: 619-644

Wang, C. R.: Soluble CD4 suppresses delayed-type hypersensitivity reaction of CD4 loosing mice by inhibiting IFN γ production. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2000, 33:93-99

Wang, B., Fujisawa, H., Zhuang, L., Freed, I., Howell, B. G., Shahid, S., Shivji, G. M., Mak, T. W., Sauder, D. N.: CD4 $^{+}$ Th1 and CD8 $^{+}$ type 1 cytotoxic T cells both play a crucial role in the full development of contact hypersensitivity. *J. Immunol.* 2000, 165(12): 6783-6790

Wang, C. R., Hino, A., Yoshimoto, T., Nagase, H., Kato, T., Hirokawa, K., Matsuzawa, A., Nariuchi, H.: Impaired delayed-type hypersensitivity response in mutant mice secreting soluble CD4 without expression of membrane-bound CD4. *Immunology* 2000, 100(3): 309-316

Winsor-Hines, D., Merrill, C., O'Mahony, M., Rao, P. E., Cobbold, S. P., Waldmann, H., Ringler, D. J., Ponath, P. D.: Induction of immunological tolerance/hyporesponsiveness in baboons with a nondepleting CD4 antibody. *J. Immunol.* 2004, 173: 4715-4723

Wofsy, D.: Strategies for treating autoimmune disease with monoclonal antibodies. *Wets. J. Med.* 1985, 143: 804-809

Wofsy, D. and Seaman, W. E.: Successful treatment of autoimmunity in NZB/NZW F1 mice with monoclonal antibody to L3T4. *J. Exp. Med.* 1985, 161: 378-391

Xu, H., Banerjee, A., Dilulio, N. A., Fairchild, R. L.: Development of effector CD8 $^{+}$ T cells in contact hypersensitivity occurs independently of CD4 $^{+}$ T cells. *J. Immunol.* 1997, 158: 4721-4728

Xu, H., Dilulio, N. A., Fairchild, R. L.: T cell populations primed by hapten sensitization in contact sensitivity are distinguished by polarized patterns of cytokine production: interferon γ -producing (Tc1) effector CD8 $^{+}$ T cells and interleukin (IL) 4/IL-10-producing (Th2) negative regulatory CD4 $^{+}$ T cells. *J. Exp. Med.* 1996, 183: 1001-1012

Yin, D. and Fathman, C. G.: Induction of tolerance to heart allografts in high responder rats by combining anti-CD4 with CTLA4lg. *J. Immunol.* 1995, 155: 1655-1659

Yoshimoto, T. and Paul, W. E.: CD4pos, NK1.1pos T cells promptly produce Interleukin 4 in response to in vivo challenge with anti-CD3. J. Exp. Med. 1994, 179: 1285-1295

Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Datum

Unterschrift

Tabellarischer Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Stefan Köhler
Geburtsdatum: 27.02.1977
Geburtsort: Gotha
Familienstand: verheiratet

Anschrift: Arndtstraße 25c, 04275 Leipzig

Ehefrau: Kati Köhler – Krankenschwester

Kinder: Lilly Köhler
Emma Köhler

Eltern: Gerhard Köhler – Fachzahnarzt
Eve Köhler – Fachzahnärztin

Geschwister: Dr. med. Thomas Köhler – Facharzt für Anästhesie,
Intensivtherapie und Notfallmedizin
Dr. med. dent. Christian Köhler – Fachzahnarzt
M. Köhler – Fachzahnarzt

Schulbildung:

09/1983 – 08/1991 POS Georgi Dimitroff Olbernhau
09/1991 – 08/1995 Gymnasium Olbernhau
Abschluss der Schulausbildung mit Abitur

Hochschulbildung:

10/1996 Immatrikulation an der Universität Leipzig (Humanmedizin)
08/1998 Ärztliche Vorprüfung
08/1999 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
03/2002 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
11/2003 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Famulaturen:

03/2000 Innere Medizin/ Kardiologie bei Prof. Dr. med. Schauer
Universität Leipzig

07/2000 Chirurgie/ Visceralchirurgie bei Prof. Dr. med. Achatz
Städt. Klinikum Sankt Georg Leipzig

03/2001 Innere Medizin bei Dr. med. Kunz
Kreiskrankenhaus Mittleres Erzgebirge, Haus Olbernhau

07/2001 Chirurgie bei Dr. med. Friedrich
Kreiskrankenhaus Mittleres Erzgebirge, Haus Olbernhau

08/2001 Allgemeinmedizin bei Dr. med. Matthes
Praxis für Allgemeinmedizin Olbernhau

Praktisches Jahr:

- 10/2002 – 02/2003 Neurologie bei Prof. Dr. med. Wagner, Klinik und Poliklinik für Neurologie, Universität Leipzig – Intensivstation
02/2003 – 06/2003 Innere Medizin bei Prof. Dr. med. Schauer, Medizinische Klinik und Poliklinik I, Universität Leipzig, Abt. für Pulmologie, Abt. für Kardiologie
06/2003 – 10/2003 Chirurgie bei Prof. Dr. med. Josten, Klinik und Poliklinik für Traumatologie und Wiederherstellungschirurgie, Universität Leipzig, Stat. für Traumatologie, Intensivstation

Zivildienst:

- 09/1995 – 10/1996 Kreiskrankenhaus Mittleres Erzgebirge, Haus Olbernhau, Abt. für Chirurgie

Beruflicher Werdegang:

- 08/2004 – 09/2004 Arzt im Praktikum an der Klinik und Poliklinik für Neurologie des Universitätsklinikums Leipzig, tätig als wissenschaftlicher Mitarbeiter (Studienarzt) der neurologischen Intensivstation
10/2004 – 08/2005 Arzt in Weiterbildung an der Klinik und Poliklinik für Neurologie des Universitätsklinikums Leipzig, tätig als wissenschaftlicher Mitarbeiter (Studienarzt) der neurologischen Intensivstation mit Betreuung von 17 Akutstudien zum Schlaganfall
09/2005 – 05/2007 Arzt in Weiterbildung an der Klinik und Poliklinik für Neurologie des Universitätsklinikums Leipzig, tätig als Assistenzarzt auf der neurologischen Intensivstation
06/2007 – 12/2007 Arzt in Weiterbildung an der Klinik und Poliklinik für Neurologie des Universitätsklinikums Leipzig, tätig als Assistenzarzt auf der neurologischen Normalstation
01/2008 – 12/2008 Arzt in Weiterbildung an der Klinik für Psychiatrie des Universitätsklinikums Leipzig, tätig als Assistenzarzt auf der Akutstation und Allgemeinstation
01/2009 – 06/2009 Arzt in Weiterbildung an der Klinik und Poliklinik für Neurologie des Universitätsklinikums Leipzig, tätig als Assistenzarzt auf der neurologischen Normalstation
07/2009 – 12/2009 Arzt in Weiterbildung an der Klinik und Poliklinik für Neurologie des Universitätsklinikums Leipzig, tätig als Assistenzarzt in der allgemeinen Ambulanz und Notfallaufnahme, mit Betreuung von Studien zur multiplen Sklerose
01/2010 – 07/2011 Arzt in Weiterbildung an der Klinik und Poliklinik für Neurologie des Universitätsklinikums Leipzig, tätig als Assistenzarzt in der Funktionsabteilung
26.07.2011 Ablegen der Facharztprüfung zum Facharzt für Neurologie
30.11.2011 Ablegen der Facharztprüfung zum Führen der Zusatzbezeichnung Intensivmedizin
seit 08/2011 tätig im Diakonissenkrankenhaus Leipzig als Facharzt für Neurologie und Arzt in Weiterbildung an der Klinik für Anästhesie, Intensivmedizin und Schmerztherapie des
-

Diakonissenkrankenhaus Leipzig, tätig als Assistenzarzt auf der Intensivstation und im OP Saal

Fortbildungen:

03/2006 – 05/2006 Weiterbildung zum zertifizierten Taucherarzt und Druckkammerbediener (nach GTÜM)
09/2006 Abschluss Kursus zur Erlangung der Zusatzbezeichnung Notfallmedizin

Veröffentlichungen:

1. Köhler, S., Uhlmann, P., Brecht, R., Landau, M., Emmrich, F., Laub, R. (2001)
Anti-CD4 may differentially regulate the delayed-type hypersensitivity response.
Immunobiol. 204: 332.
2. Köhler, S., Uhlmann, P., Brecht, R., Landau, M., Emmrich, F., Laub, R. (2001)
In vivo characterization of anti-human CD4 mAbs in multiple transgenic CD4/DR3 mice. Immunobiol. 204: 113.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Insbesondere meinen Eltern für die moralische und finanzielle Unterstützung während meines Studiums und der Anfertigung dieser Dissertation. Sie spendeten mir immer Hoffnung und neuen Mut in manch schwieriger Situation. Aber auch meiner Ehefrau und meinen beiden Kindern, die immer geduldig mit mir waren und jederzeit für mich da waren und mir den nötige Zuversicht und die Zeit gaben.

Daneben möchte ich mich bei Dr. rer. nat. Rüdiger Laub für die Überlassung des Themas, für die nahezu unendliche Geduld, das freundschaftliche Verhältnis und die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente sowie der Abfassung dieser Dissertation.

Professor Dr. med. Emmrich danke ich für die Möglichkeit, die erforderlichen Arbeiten und Experimente in den Laboratorien des Institutes Für klinische Immunologie und Transfusionsmedizin durchführen zu können.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. rer. Nat. Dirk Mischke, Dr. med. Philipp Uhlmann und Kerstin Wenk für lebhafte Diskussionen und Unterstützung bei der Durchführung der Experimente bedanken.
